

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE METABOLITOS
AISLADOS EN UN EXTRACTO CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA DE LA ASCIDIA
Rhopalaea sp. PROVENIENTE DEL ÁREA DE
CUAJINIQUIL, GUANACASTE, COSTA RICA**
por

Henry Borbón Alpízar

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of

MASTER OF SCIENCE
in
CHEMISTRY

UNIVERSITY OF PUERTO RICO
MAYAGÜEZ CAMPUS
2009

Approved by:

Félix R. Román, Ph.D.
President, Graduate Committee

Date

Luis Morell, Ph.D.
Member, Graduate Committee

Date

Robert Rios, Ph.D.
Member, Graduate Committee

Date

Julio Morell, Ph.D.
Representative of Graduate Studies

Date

Francis Patrón, Ph.D.
Chairperson of the Department

Date

ABSTRACT

Marine ecosystems have a very large amount of resources, most of them are still partially unknown, and few have been exploited for development of new industrial and toxicological products. The objective of this investigation was to determine if ascidia *Rhopalaea* sp. from the Pacific coast of Costa Rica had these chemical defenses against the bacteria *Staphylococcus aureus* and fungi *Geotrichum candidum*, and if so, to determine their main secondary metabolites in the extract. Ascidian was collected from the zone of Cuajiniquil, Guanacaste, between December 2007 and March 2008. Activity evaluation against the Gram positive bacteria and fungi was performed on ethanolic (95%) and acetonic extracts. Both extracts showed activity against *Geotrichum candidum* but only the acetonic extract showed activity against *Staphylococcus aureus*. A coumarin and one hydroxyanthraquinone were isolated from a crude extract of *Rhopalaea* sp. as metabolites present in the active fraction. The purification and isolation were performed by chromatographic techniques and solid phase extraction. Structural information was obtained by spectroscopy analyses: Ultraviolet (UV-Visible), Fourier Transform Infrared (FT-IR), Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS), Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS), Nuclear Magnetic Resonance of Proton ($^1\text{H-NMR}$), and Carbon-13 ($^{13}\text{C-NMR}$). Further studies are necessary for a characterization of their active components of this extract and a possible elucidation of the mechanisms of action.

RESUMEN

Los ecosistemas marinos poseen una gran cantidad de recursos escasamente explotados que tienen grandes perspectivas para el desarrollo de nuevos productos industriales y toxicológicos. El objetivo de esta investigación fue determinar si la ascidia *Rhopalaea* sp. de la costa Pacífica de Costa Rica presenta estas defensas químicas contra la bacteria *Staphylococcus aureus* y el hongo *Geotrichum candidum*, y si es así, determinar metabolitos secundarios presentes en el extracto. Se colectó la ascidia en la zona de Cuajiniquil en la provincia de Guanacaste entre los meses de diciembre del 2007 y marzo del 2008. Se realizaron extractos crudos en acetona y etanol al 95% para evaluar la actividad contra una bacteria Gram positiva y un hongo. Ambos extractos presentaron actividad contra *Geotrichum candidum* y el extracto acetónico mostró actividad contra *Staphylococcus aureus*. Se logró aislar y caracterizar globalmente una cumarina y una hidroxiantraquinona como metabolitos presentes en la fracción responsable de la actividad biológica presentada. La purificación fue llevada a cabo con técnicas cromatográficas y extracción en fase sólida. La información estructural fue obtenida por análisis espectroscópicos; Ultravioleta (UV-Visible), Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR), Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC/MS/MS), Cromatografía de Gases acoplada a Masas (GC-MS), Resonancia Magnética Nuclear de Protón ($^1\text{H-NMR}$) y Resonancia Magnética de Carbono 13 ($^{13}\text{C-NMR}$). Se recomienda estudios futuros para la caracterización de los principios activos de este extracto y una posible elucidación de sus mecanismos de acción.

Dedico este trabajo a mi madre
Nuria por todo el apoyo, cariño, amor y paciencia.
Por ser mi ejemplo de esfuerzo, responsabilidad,
humildad y amor hacia los demás.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar siempre a mi lado en todo momento de mi vida.

A mis padres, por todo su apoyo y enseñanza, por ser en muchos aspectos mis ejemplos a seguir en mi formación como persona.

Al PhD. Félix R. Román, director de tesis, y al PhD. Luis Morell, infinitas gracias por sus enseñanzas y apoyo en todos los momentos, por su disponibilidad y por toda la formación que me dieron el privilegio de recibir. La gran mayoría de aspectos positivos para mi vida profesional que aprendí en Puerto Rico se los debo a ustedes.

A Gildreth González, directora del Departamento de Intercambio Estudiantil, Myrna Ayala e Ilia Vélez, colaboradoras del mismo departamento, por toda la ayuda y apoyo brindado a través de mis dos años de estancia en Puerto Rico. Todo su aprecio brindado este tiempo me ha llevado a considerarlas como mi familia puertorriqueña.

A Luis Álamo y Miguel Froilán por su tiempo y buena voluntad en ayudarme y enseñarme la manipulación en la parte instrumental.

A la Escuela de Biología de la Universidad Nacional en Costa Rica por el aporte que le dieron a esta investigación en los aspectos técnicos y metodológicos, en especial a la Lic. Maribel Cordero Villalobos por toda la colaboración que nos brindó.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
Abstract	ii
Resumen	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice de contenido	vi
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	viii
Índice de fotos	x
Índice de abreviaturas	xi
I Introducción	
1.1 Antecedentes y justificación.....	1
1.2 Aspectos relacionados con las ascidias.....	3
1.3 Aplicaciones de las ascidias.....	8
1.4 Rol de los químicos en microorganismos.....	12
1.5 Perspectivas del estudio de las ascidias en Costa Rica.....	14
1.6 Objetivos.....	17
II Parte experimental	
2.1 Recolección de las ascidias.....	18
2.2 Equipo y reactivos.....	19
2.3 Metodología.....	20
III Discusión de los resultados	
3.1 Actividad Antibacterial.....	26
3.2 Purificación y aislamiento de los metabolitos.....	28
3.3 Análisis espectroscópico de los metabolitos aislados.....	29
IV Conclusiones y Recomendaciones	
4.1 Conclusiones.....	45
4.2 Recomendaciones.....	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1.1. Clasificación taxonómica de la ascidia <i>Rhopalacea</i> sp.....	6
Cuadro 2.1. Condiciones cromatográficas empleadas para analizar los compuestos de la fracción 3 mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).....	23
Cuadro 2.2. Condiciones del espectrómetro de masas Bruker Esquire 6000 Electrospray API-ES empleadas para analizar los compuestos de la fracción 4.....	25
Cuadro 3.1. Actividad antibiótica de extractos de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. de la costa del Pacífico de Costa Rica contra <i>Erwinia caratovora</i> y <i>Geotrichum candidum</i>	26
Cuadro 3.2. Datos de máximas absorbancias obtenidas en el espectro UV-Visible del compuesto 01 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp.....	30
Cuadro 3.3. Señales del espectro de masas y relación isotópica de los picos correspondientes al ión molecular del compuesto 01 de la ascidia <i>Rhopalacea</i> sp.....	32
Cuadro 3.4. Desplazamientos de cada uno de los carbonos en el espectro de ¹³ C RMN para el compuesto 01 de la ascidia <i>Rhopalacea</i> sp.....	35
Cuadro 3.5. Información espectroscópica de cada una de las señales del espectro de ¹ H RMN para el compuesto 01 de la ascidia <i>Rhopalacea</i> sp.....	36
Cuadro 3.6. Datos de máximas absorbancias obtenidas en el espectro UV-Visible del compuesto 02 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp.....	38
Cuadro 3.7. Señales del espectro de masas y relación isotópica de los picos correspondientes al ión molecular del compuesto 02 de la ascidia <i>Rhopalacea</i> sp.....	39
Cuadro 3.8. Desplazamientos de cada uno de los carbonos en el espectro de ¹³ C RMN para el compuesto 02 de la ascidia <i>Rhopalacea</i> sp.....	41
Cuadro 3.9. Información espectroscópica de cada una de las señales del espectro de ¹ H RMN para el compuesto 02 de la ascidia <i>Rhopalacea</i> sp.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1.1. Ascidia solitaria.....	4
Figura 1.2. Ascidia colonial.....	4
Figura 1.3. Estructura de una larva de ascidia	5
Figura 1.4. Vista lateral esquemática de una ascidia solitaria.....	6
Figura 1.5. Ascidia del género <i>Rhopalaea</i>	7
Figura 1.6. Compuestos con actividad farmacológica aislados de ascidias a) Didemnina B, b) Aplidina y c) Ecteinascidina 743.....	9
Figura 1.7. Rhopaladine C aislado de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. de la isla de Okinawa.....	11
Figura 1.8. Nuevos alcaloides aislados de la ascidia <i>Aplidium meridianum</i> 1) Meridianine B 2) Meridianine C 3) Meridianine D 4) Meridianine E.....	11
Figura 1.9. β -carbólicos aislados de la ascidia <i>Eudistoma olivaceum</i> : Eudistomins A (1), G (2), H (3), P(4), D (5), J (6), N (7), O (8), R (9), S (10), C (11), E (12), F (13), K (14), L (15).....	12
Figura 2.1. Lugar de recolección de <i>Rhopalaea</i> sp.....	18
Figura 3.1. Cromatograma del compuesto 01 purificado y aislado de la fracción 4 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. mediante HPLC a una longitud de onda de 258 y 280 nm con una columna analítica Supelcosil LC-NH ₂ de 25 cm x 4.6 mm, de 5 μ m utilizando como disolvente una mezcla isocrática de metanol/H ₂ O 50:50.....	28
Figura 3.2. Cromatograma del compuesto 02 purificado y aislado de la fracción 4 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. mediante HPLC a una longitud de onda de 258 y 280 nm con una columna analítica Supelcosil LC-NH ₂ de 25 cm x 4.6 mm, de 5 μ m utilizando como disolvente una mezcla isocrática de metanol/H ₂ O 50:50.....	29
Figura 3.3. Espectro UV-Visible del compuesto 01 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. obtenido de su fracción 4 en el HPLC Agilent 1100 Series con Arreglo de Diodos utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de metanol/H ₂ O 50:50.....	30

Figura 3.4. Espectro infrarrojo del compuesto 01 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. analizado en el equipo Bruker Modelo IFS 66 v/S en una pastilla de KBr.....	31
Figura 3.5. Espectro de masas del compuesto 01 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. realizado en un MS/MS Bruker Esquire 6000 con ionización de electrospray.....	32
Figura 3.6. Cromatograma (A) y espectro de masas (B) del compuesto 01 purificado y aislado de la fracción 4 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. obtenido mediante GC-MS con ionización electrónica y espectro de masas (C) de la 2H-1-Benzopyran-2-ona (D).....	33
Figura 3.7. Espectro de ¹³ C RMN del compuesto 01 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. disuelto en CDCl ₃ , realizado en un NMR Bruker Avance de 500 MHz.....	34
Figura 3.8. Espectro de ¹ H RMN del compuesto 01 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. disuelto en CDCl ₃ , realizado en un NMR Bruker Avance de 500 MHz.....	36
Figura 3.9. Espectro UV-Visible del compuesto 02 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. obtenido de su fracción 4 en el HPLC Agilent 1100 Series con Arreglo de Diodos utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de metanol/H ₂ O 50:50.....	37
Figura 3.10. Espectro infrarrojo del compuesto 02 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. analizado en el equipo Bruker Modelo IFS 66 v/S en una pastilla de KBr.....	38
Figura 3.11. Espectro de masas del compuesto 02 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. realizado en un MS/MS Bruker Esquire 6000 con ionización de electrospray.....	39
Figura 3.12. Espectro de ¹³ C RMN del compuesto 02 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. disuelto en DMSO-d ₆ , realizado en un NMR Bruker Avance de 500 MHz.....	40
Figura 3.13. Espectro de ¹ H RMN del compuesto 02 de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. disuelto en DMSO-d ₆ , realizado en un NMR Bruker Avance de 500 MHz.....	42
Figura 3.14. Puente de hidrógeno responsable de desplazar dicho hidrógeno del fenol a campo bajo en el espectro ¹ H-RMN	43
Figura 3.15. Estructura base de una cumarina.....	43
Figura 3.16. Estructura base de una hidroxiantraquinona.....	44

ÍNDICE DE FOTOS

Foto	Página
Foto 1. Secado de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp.....	54
Foto 2. Halo de inhibición producido por el extracto crudo de <i>Rhopalaea</i> sp. contra <i>Staphylococcus aureus</i>	54
Foto 3. Halos de inhibición producidos por la fracción cuatro de la ascidia <i>Rhopalaea</i> sp. contra <i>Staphylococcus aureus</i>	55
Foto 4. Blanco del bioensayo.....	55

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

^{13}C -NMR	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
^1H -NMR	Resonancia Magnética Nuclear de Protio
CDCl_3	Deuterocloroformo
DMSO-d_6	Dimetil Sulfoxido deuterado
FNL	Fábrica Nacional de Licores
FT-IR	Infrarrojo con Transformada de Fourier
GC-MS	Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masa
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (del inglés)
THF	Tetrahidrofurano

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes y justificación

La historia de los productos naturales bioactivos inició hace más de 100 años. En el sentido más amplio, éstos se definen usualmente como los compuestos químicos derivados y aislados de los organismos vivos de la naturaleza como las plantas, animales, microorganismos y especies marinas, sintetizados durante el metabolismo primario o secundario de los mismos (Mann, 1996).

Se ha confirmado que los metabolitos secundarios constituyen una fuente de productos naturales con actividad biológica diversa comprobándose, entre otras, su actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antineoplásica, anticancerígena, anticoagulante, citotóxica, hipocolesterolémica, antihelmíntica, insecticida, neurotóxica, molusquicida, inhibidores o promotores de crecimiento vegetal. Esta gama de propiedades, permite a estos compuestos tener un gran potencial de aplicación, ya sea aislándolo o usando directamente el extracto o infusión del compuesto al que se le ha detectado una actividad biológica específica, empleándolo como precursor en la síntesis de compuestos orgánicos o para caracterizar la estructura de sus centros activos con el fin de modelar nuevas sustancias con propiedades preestablecidas (González, 2001).

El creciente interés por el estudio de los metabolitos secundarios ha dado origen a la descripción de un gran número de compuestos. Esto ha sido motivado por inquietudes farmacológicas en un principio y, posteriormente, por conocer el rol que estos metabolitos desempeñan durante el ciclo vital de los organismos que los sintetizan, así como, llegar a comprender cómo estos compuestos contribuyen al funcionamiento de los sistemas ecológicos (González, 2001; Fuller et al., 1992).

Con el paso del tiempo las investigaciones químicas relacionadas con el aislamiento, biosíntesis y elucidación estructural de nuevos compuestos provenientes de la naturaleza han contribuido con el avance farmacéutico y agrícola, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades y plagas, mediante la formulación de nuevos productos químicos (AL-Zereini, 2006).

La química de los productos naturales está estrechamente relacionada con el aislamiento, biosíntesis y elucidación de estructuras de nuevos compuestos químicos que actúen como poderosos agentes protectores, tanto de la salud humana como de los cultivos agrícolas. Debido a su diversidad química y sus variadas actividades contra diversas enfermedades, los productos naturales juegan un rol importante dentro de la investigación agrícola y farmacéutica (Faulkner, 2002).

A pesar de la gran extensión del océano mundial, las formas de vida marina permanecen aún poco exploradas como una fuente de sustancias industriales (Pesando, 1990), siendo las plantas terrestres las que constituyen todavía la fuente principal de estudios con este fin. La mayor parte de la investigación biomédica marina ha sido desarrollada en animales, principalmente invertebrados tales como: esponjas, poliquetos, moluscos y equinodermos (Green, 1977; Bakus et al., 1986). Fue hasta finales de la década de los cuarenta que los científicos se interesaron en realizar estudios con organismos marinos (Proksch et al., 2003). La línea de investigación química en productos naturales marinos se inició a finales de la década de los setenta. Su crecimiento acelerado se atribuye a los novedosos compuestos bioactivos que han sido aislados a partir de los organismos marinos, además del gran potencial de los mismos en diversos campos, especialmente en la producción de nuevos fármacos para la cura de enfermedades. El interés de la ciencia por el ambiente marino se ve reflejado con el incremento en el número de publicaciones científicas, en el descubrimiento de numerosos compuestos químicos bioactivos y la gran cantidad de organismos marinos estudiados con el paso de los años (Riguera, 1997).

Los resultados de los estudios en productos naturales marinos indican que más del 80% de sus aplicaciones van dirigidas a tres campos principales, los cuales corresponden a la salud humana, la alimentación y la industria cosmética. Por tanto la razón primordial de las investigaciones en productos naturales marinos es la búsqueda de compuestos químicos bioactivos útiles y aplicables para los seres humanos (Riguera, 1997). Según AL-Zereini (2006) para el año 2003 alrededor de un 6% del total de los productos naturales marinos fueron obtenidos de tunicados, donde el mayor problema es su identificación debido a su complicada taxonomía.

No obstante, son pocos los estudios realizados con urocordados (tunicados) marinos como las ascidias alrededor del mundo. En países como Cuba, Puerto Rico, Brasil, Estados Unidos y España se han llevado a cabo estudios biológicos, taxonómicos y químicos de dichos organismos (Proksch et al., 2003). Sin embargo, los reportes investigativos en Costa Rica con respecto a la actividad y aislamiento de compuestos a partir de ascidias han sido escasos, debido al poco impulso que ha tenido este campo y a la difícil clasificación de este tipo de organismos marinos (Davies-Coleman and Beukes, 2004).

1.2 Aspectos relacionados con las ascidias

Hace más de 630 millones de años evolucionó un nuevo patrón de desarrollo embrionario, apareciendo una nueva línea de animales, los deuterostomados, que incluye dos filos superficialmente diferentes: los equinodermos (phylum Echinodermata) y los cordados (phylum Chordata) que incluyen a los vertebrados (Ruppert and Barnes, 1996).

El filo cordado está compuesto por los siguientes grupos: los Protocordados (Acráneos) y los Craneados. Dentro del grupo de los Protocordados existen dos subfilos; los Urocordados o Tunicados, al cual pertenecen las ascidias; y los Cefalocordados, donde se incluyen las lancetas marinas (Pough, 1996).

Los urocordados (cordados con cola) o tunicados comprenden alrededor de 3000 especies ampliamente distribuidas por todos los mares, desde cerca de la costa hasta grandes profundidades. La mayoría son sésiles en estado adulto, aunque algunos son libres. El nombre tunicados está sugerido por la túnica exoesquelética resistente e inerte que reviste y protege al animal, la cual está formada por proteínas, agua y carbohidratos, contiene también células sanguíneas y fibras estructurales formadas por una clase de celulosa llamada tunicina, que proporciona a la túnica resistencia y elasticidad. Cuando son adultos, los tunicados son cordados altamente especializados, ya que en la mayoría de sus especies solamente la forma larvaria (semejante a un renacuajo microscópico) presenta las características distintivas de los cordados. Durante la metamorfosis la notocorda y la cola desaparecen mientras que el cordón nervioso dorsal queda reducido a un simple ganglio (Ruppert and Barnes, 1996).

Las especies del subfilo Urocordados están clasificadas en cuatro clases: Ascidiacea, Sorberacea, Thaliacea y Appendicularia (McClintock and Baker, 2001). La clase Ascidiacea corresponde a la más variada y extensa de las cuatro clases de tunicados, y la única con química reportada. El número total de especies de ascidias existentes en el mundo no es conocido, sin embargo se estima que sobrepasa los cientos (McClintock and Baker, 2001).

Todas las especies de ascidias, excepto unas pocas, son organismos marinos sésiles, uno de sus extremos se fija al sustrato y el opuesto tiene dos aberturas que corresponden al sifón bucal (inhalante) y al sifón atrial (exhalante). Las ascidias son hermafroditas y son llamadas popularmente “jeringas de mar” debido a que algunas especies descargan con fuerza un chorro de agua por el sifón exhalante cuando se les irrita (Caridad, 2005).

Las ascidias pueden encontrarse desde aguas poco profundas hasta más de 200 m de profundidad, su longitud varía desde 1 mm a 18 cm. Estos animales pueden ser solitarios, coloniales o compuestos, aunque los más abundantes son los coloniales, como se ilustra en las Figuras 1.1 y 1.2 (Caridad, 2005).

Las ascidias solitarias tienen normalmente formas esféricas o cilíndricas hasta formas totalmente irregulares. Hacia el exterior se observan dos salientes, el sifón inhalante y el sifón exhalante. El extremo inferior se fija al sustrato mediante estolones como se muestra en la Figura 1.1 (Salhi, 2005).



Figura 1.1. Ascidia solitaria

Fuente: www.biophoto.net



Figura 1.2. Ascidia colonial

Fuente: www.geocities.com

Las larvas de las ascidias tienen forma alargada y transparente, (Figura 1.3) y nadan mediante la cola postanal, la musculatura somática y la notocorda. La boca de la larva dará lugar al sifón inhalante y su faringe está perforada por unas pocas hendiduras que se abren a una bolsa que la rodea llamada atrio. Aunque el atrio no abre al exterior en la larva, más tarde queda expuesto a la superficie y se transforma en el sifón exhalante (Caridad, 2005).

Al final del estado de natación libre la larva cae al fondo, momento en el cual se fija mediante tres papilas adhesivas anteriores a un sustrato. A continuación ocurre una metamorfosis radical, provocando que la cola se retraiga y se reabsorban la notocorda y el cordón nervioso, convirtiéndose en adultos sésiles (Salhi, 2005).

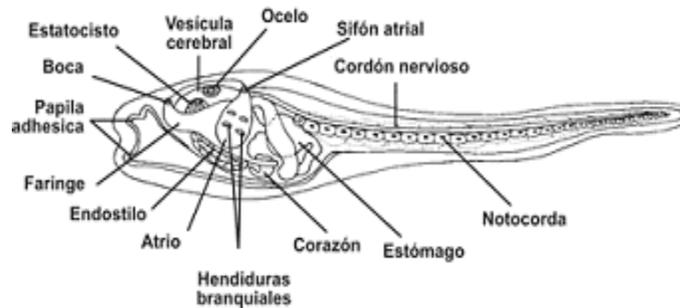


Figura 1.3. Estructura de una larva de ascidia

Fuente: www.asturnatura.net

El sifón inhalante anterior abre internamente a una gran faringe, y un círculo de tentáculos orales se extiende desde el sifón impidiendo que las partículas grandes puedan entrar con la corriente de agua. Las paredes de la faringe están perforadas por pequeñas hendiduras branquiales que permiten que el agua pase desde la cavidad faríngea al atrio circundante y salga por el sifón exhalante (Salhi, 2005).

Las ascidias son animales filtradores que recogen el plancton de la corriente de agua, del cual se alimentan, pasando por la faringe y terminando en el esófago. En la cara ventral de la faringe hay un surco profundo, el endostilo, que se extiende a lo largo de la pared de la faringe. El endostilo, que es el antecesor evolutivo de la glándula tiroidea de los vertebrados, es el centro principal de la elaboración de un mucus especializado que contiene yodo y tirosina (Salhi, 2005).

El sistema circulatorio de las ascidias está constituido por un corazón, que es un tubo corto en forma de U situado en la base del sistema digestivo (Figura 1.4). Una característica única del sistema circulatorio de los tunicados es el cambio periódico del sentido del flujo circulatorio que tiene lugar cada 2 ó 3 minutos, mediante alternancia del inicio de las ondas contráctiles en uno y otro de los extremos del corazón (Salhi, 2005). Otro rasgo destacado es la presencia de niveles significativamente altos de elementos poco comunes en la sangre, como vanadio (V) o niobio (Nb). La función de estos elementos aún es un misterio (Ruppert and Barnes, 1996).

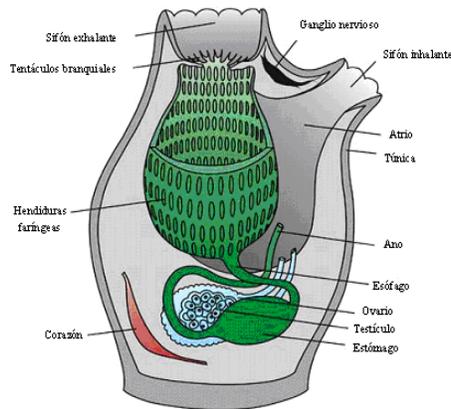


Figura 1.4. Vista lateral esquemática de una ascidia solitaria

Fuente: www.animaldiversity.com

Las ascidias, como otros tunicados, son animales amoniotéticos que eliminan el nitrógeno proteico bajo la forma de amoniaco. Sin embargo, otros productos metabólicos como el ácido úrico y el oxalato cálcico (uratos), no son excretados sino que se almacenan internamente y sólo se liberan cuando muere el animal (McClintock and Baker, 2001). La clase Ascidiacea está constituida por dos órdenes, tres subórdenes, nueve familias y cuarenta géneros. El género *Rhopalaea* (Cuadro 1.1, Figura 1.5) se encuentra dentro del orden Enterogona, suborden Phlebobranchia y pertenece a la familia Cionidae (McClintock and Baker, 2001).

Cuadro 1.1. Clasificación taxonómica de la ascidia *Rhopalaea* sp.

Phylum	Subphylum	Clase	Orden	Suborden	Familia	Género
Chordata	Urocordados	Ascidiacea	Enterogona	Phlebobranchia	Cionidae	<i>Rhopalaea</i>

Las especies del género *Rhopalaea* recolectadas en América se han caracterizado por ser ascidias solitarias que poseen una túnica lisa color violeta oscuro, semitransparente y suave. Tienen una longitud de aproximadamente 10 centímetros y ambos sifones son cortos. Su cuerpo está dividido en tórax y abdomen, este último se encuentra fijo al sustrato mediante expansiones de la túnica, normalmente adheridos a arrecifes y fisuras de las rocas (Carballo, 2006).

Estas ascidias se consideran como un grupo clave en los ecosistemas marinos, debido a la gran sensibilidad que manifiestan frente a factores de estrés como la excesiva sedimentación o la contaminación de las aguas. Además, el intenso tránsito marítimo ha permitido que estas especies se introduzcan en marinas y puertos de zonas adyacentes fuera de sus comunidades, donde contribuyen notablemente a la depuración de aguas contaminadas (industriales o urbanas), ya que acumulan e inmovilizan agentes contaminantes del agua y de los sedimentos, por lo que pueden ser utilizadas para el monitoreo y control ambiental de algunas áreas costeras (Carballo, 2006).



Figura 1.5. Ascidia del género *Rhopalaea*

Fuente: www.edge-of-reef.com

La simbiosis con algas y bacterias (incluyendo las cianobacterias) en ascidias es muy amplia, a ésta se le atribuye la coloración de las mismas y la producción de metabolitos de defensa. Además muchos de los metabolitos secundarios son muy similares a los producidos por las bacterias, y la distribución taxonómica de los metabolitos en las ascidias lo confirman (McClintock and Baker, 2001).

1.3 Aplicaciones de las ascidias

Desde mucho antes del siglo XIX, diferentes grupos de organismos marinos como algas y ascidias han sido utilizadas por la medicina tradicional china para curar enfermedades como el bocio y combatir desórdenes estomacales y de hipertensión, entre otros (Schwimmer and Schwimmer, 1955). Durante los años más recientes, los organismos marinos han incrementado la atracción de los científicos. Con el alcance en el desarrollo de la taxonomía moderna durante el siglo XIX, se logra facilitar la búsqueda de sustancias provenientes del océano, lo que cautivó el interés de los europeos debido al progreso del entendimiento en las ciencias y a los fundamentos que se habían adquirido acerca del rol de estos organismos en la farmacología y otras posibles aplicaciones (Díaz-Piferrer, 1979).

Según reportó Davidson (1993), en el caso de las ascidias, estas demostraron una especial habilidad de biosintetizar metabolitos derivados de aminoácidos, ya que más del 80% de los compuestos identificados son nitrogenados. Entre estos compuestos están incluidos los péptidos (lineales y cíclicos) y varios alcaloides, además de otras sustancias presentes de menor significancia como terpenoides, isoprenoides, hidroquinonas, derivados de ácidos grasos y poliéteres (McClintock and Baker, 2001).

En los últimos años, el descubrimiento de nuevos productos marinos con aplicación farmacológica e industrial ha intensificado el estudio taxonómico y faunístico de la clase Ascidiacea (Carballo, 2006). Las ascidias son una fuente rica en metabolitos secundarios que muestran actividades citotóxicas, antimicrobianas y antivirales (Fenical et al., 1990).

En 1980 fueron aislados una serie de metabolitos activos con importancia farmacológica a partir de ascidias. El primero de ellos, didemnin B (Figura 1.6a) de la ascidia *Trididemnum solidum*, fue el primer compuesto marino purificado que se introdujo en pruebas clínicas contra el cáncer humano, estas evidenciaron la inhibición de la síntesis de ARN, ADN y de proteínas en varias células cancerígenas, además de mostrar actividad anti-viral e inmunosupresiva (Rajeev and Xu, 2004). Posteriormente en 1999, la aplidina (Figura 1.6b) aislada de *Aplidium albicans*, superó la actividad del didemnin B (Blunt et al., 2006). Finalmente la ecteinascidina 743 (Figura 1.6c) se aisló de la especie *Ecteinascidia turbinata*, el cual es el compuesto activo del fármaco conocido como yondelis, designado en el 2001 por la EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) como efectivo contra el sarcoma de tejidos blandos, y en el 2003 para el

cáncer de ovario (Carballo, 2006). La aplidina actualmente está sometida a pruebas clínicas para el tratamiento del melanoma y carcinomas colorrectales, renales, medulares de tiroides, pulmonares, pancreales, de cabeza y de cuello (no cerebral). Asimismo, la aplidina también muestra actividad para el tratamiento de neoplasias malignas, leucemia pediátrica y linfomas humanos (Blunt et al., 2006).

Según Rinehart (2000) los compuestos didemnin B, aplidina, y ecteinascidina 743 aislados de diferentes especies de ascidias, pertenecen al grupo de los seis metabolitos bioactivos derivados de organismos marinos que han tenido mayor relevancia en las actuales líneas de investigación farmacológica y que están siendo evaluados clínicamente para su posible aplicación como tratamiento de enfermedades presentes en los seres humanos.

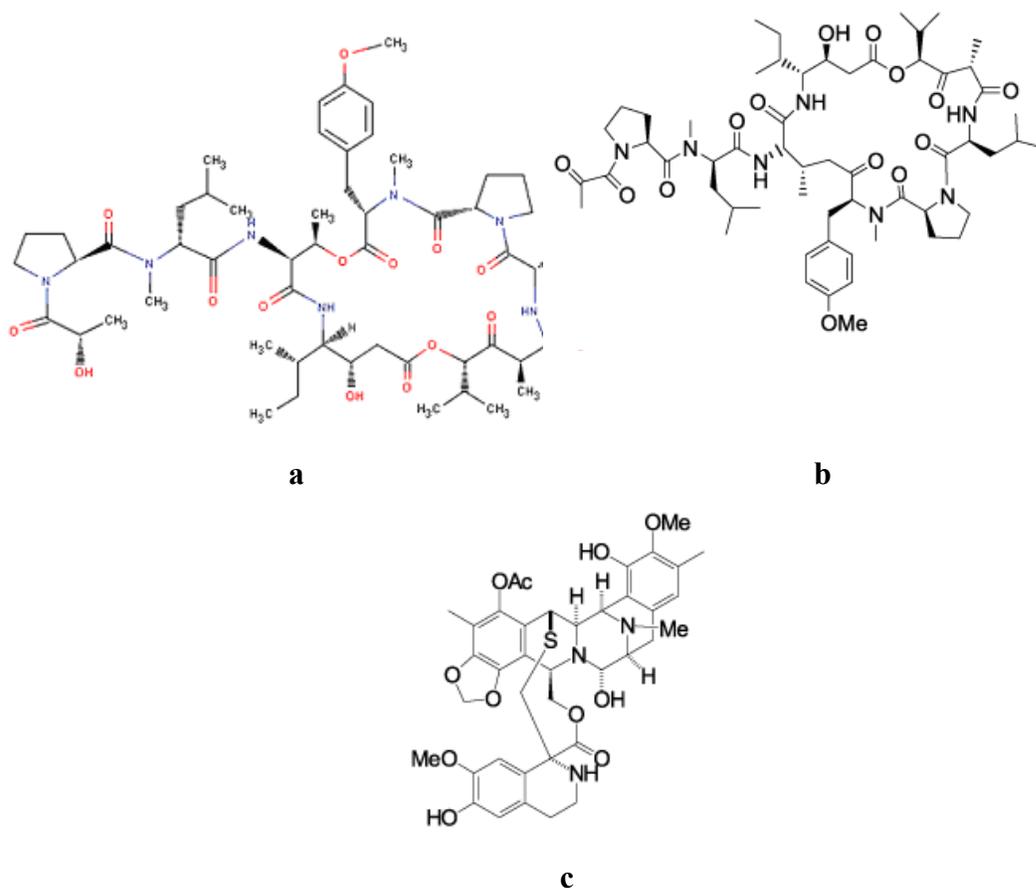


Figura 1.6. Compuestos con actividad farmacológica aislados de ascidias
a) Didemnin B, b) Aplidina y c) Ecteinascidina 743

Fuente: Faulkner, 2002.

Dentro de los trabajos reportados en “Marine Natural Products” hasta el año 2006 enfocados en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios bioactivos presentes en ascidias están los de Hooper (1995) reportando un metabolito amino derivado aislado de la ascidia *Pseudodistoma* sp. que revelaba propiedades antimicrobianas; García et al. (1996) en el siguiente año aisló cinco metabolitos de la especie *Leptoclinides dubius*, derivados de aminoácidos que mostraron citotoxicidad. Más adelante Liu et al. (2005) reportaron el compuesto lissoclibadin 1 aislado de la especie *Lissoclinum* cf. *badium* con actividad antibacterial, y Doisy et al. (2004) aisló la halocidina, un péptido antimicrobial de la especie *Halocynthia aurantium* (Blunt et al., 2006). El metabolito styelins A-E aislado de la ascidia solitaria *Styela clava*, reportado como un derivado del aminoácido fenilalanina, mostró actividad inhibitoria contra microorganismos patógenos humanos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Lehrer et al., 2003).

Los autores Hooper (1995), García et al. (1996) y Lehrer et al. (2003) han concluido que los metabolitos secundarios aislados por ellos de las especies *Pseudodistoma* sp., *Leptoclinides dubius* y *Styela clava*, respectivamente, son derivados de aminoácidos. Además fueron sometidos a estudios antimicrobianos obteniéndose resultados positivos.

Aún sabiendo que los metabolitos secundarios obtenidos a partir de ascidias pueden tener bioactividad contra cepas bacterianas e incluso a las resistentes a antibióticos comerciales, son muy pocos los estudios realizados al respecto. Entre ellos también se destacan los compuestos polisulfurados aislados por Makawva et al. (1995) de la ascidia *Polycitor* sp., los cuales mostraron potentes actividades inhibitorias contra patógenos humanos como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

De la ascidia *Rhopalaea* sp. cerca de la isla de Okinawa en Japón se encontró que produce un alcaloide llamado Rhopaladine C (Figura 1.7) que muestra actividad antibacterial contra las bacterias patógenas *Sarcia lutea* y *Corynebacterium xerosis* (Sato et al., 1998). Otra especie de ascidia, *Aplidium meridianum*, presentó nuevos alcaloides indólicos, llamados meridianine B, C, D y E (Figura 1.8) que han demostrado actividad contra células adenocarcinomas (Franco et al., 1998). También de la ascidia *Eudistoma olivaceum* del Mar Caribe se han aislado varios tipos de β -carbólicos: Eudistomins A, G, H, P, D, J, N, O, R, S, C, E, F, K, y L (Figura 1.9, en el orden citado), todos los cuales presentan alta actividad antiviral y antibacterial (Davidson, 1993).

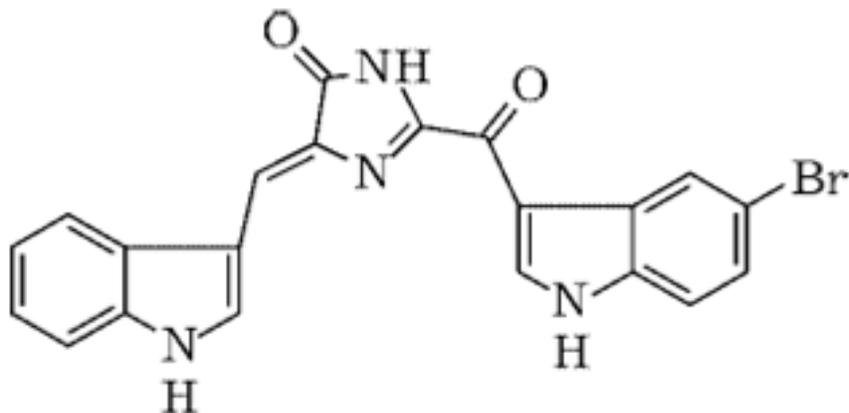
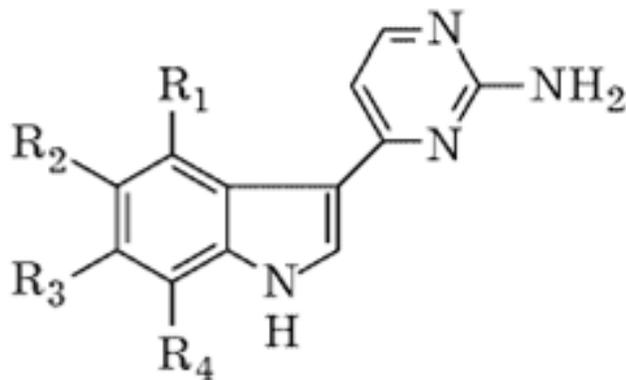


Figura 1.7. Rhopaladine C aislado de la ascidia *Rhopalaea* sp. de la isla de Okinawa

Fuente: Sato et al., 1998



1. $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = \text{Br}$
2. $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$
3. $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = \text{Br}$
4. $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{Br}$

Figura 1.8. Nuevos alcaloides aislados de la ascidia *Aplidium meridianum*

1) Meridianine B 2) Meridianine C 3) Meridianine D 4) Meridianine E

Fuente: Franco et al., 1998

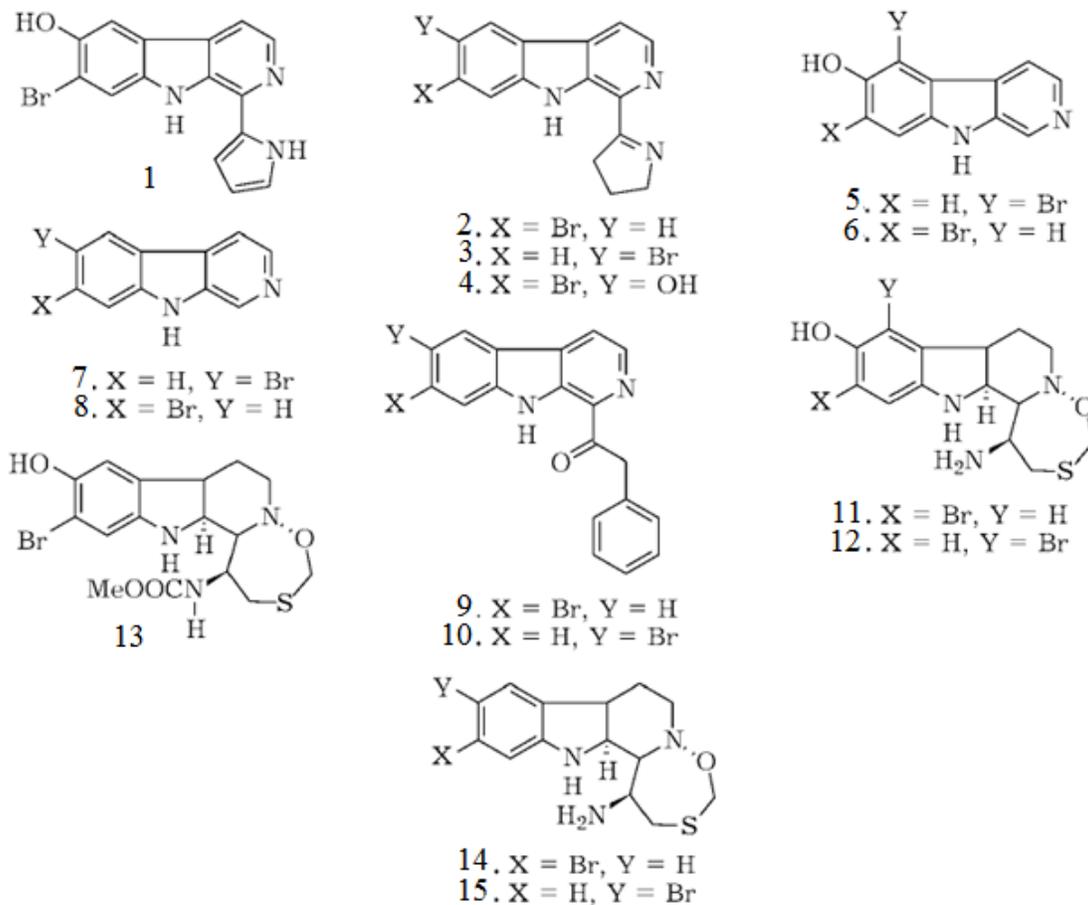


Figura 1.9. β -carboline aislados de la ascidia *Eudistoma olivaceum*: Eudistomins A (1), G (2), H (3), P(4), D (5), J (6), N (7), O (8), R (9), S (10), C (11), E (12), F (13), K (14), L (15)

Fuente: Davidson, 1993

1.4 Rol de los biocompuestos en microorganismos

Con el paso de los años, se han desarrollado mundialmente extensos programas de investigación química que han permitido la síntesis de compuestos bioactivos y sus correspondientes modos de acción. La creciente necesidad por descubrir drogas capaces de controlar las enfermedades emergentes y la resistencia desarrollada por los fármacos ya existentes a los patógenos comunes, ha despertado el interés de numerosos científicos. La exploración del océano como nueva fuente de conocimiento, con el propósito de obtener productos naturales bioactivos mediante el aislamiento de nuevos metabolitos, a partir de organismos marinos como las ascidias ha generado gran expectativa (Rajeev and Xu, 2004).

Los agentes antibióticos son utilizados para el tratamiento de enfermedades bacterianas y actúan sobre los microorganismos inhibiendo la síntesis de la pared celular, activando enzimas que destruyen dicha estructura, aumentando la permeabilidad de la membrana celular e interfiriendo con la síntesis proteica y el metabolismo de los ácidos nucleicos. Sin embargo, cada antibiótico actúa de manera selectiva con tipos específicos de microorganismos y éstos pueden desarrollar resistencia sobre los primeros (Berkow and Fletcher, 1990).

Uno de los principales factores en la diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos entre poblaciones bacterianas es el amplio uso y abuso de los mismos en diversas actividades humanas como lo son el tratamiento de infecciones en seres humanos y animales, como promotores de crecimiento en animales de producción y como pesticidas para el control de plagas en agricultura. De esta forma, diversos ambientes se constituyen en reservorios importantes de bacterias resistentes a antibióticos (García, 2007). La resistencia microbiana a agentes antibióticos es considerada por la Organización Mundial de la Salud como uno de los problemas emergentes más importantes a nivel mundial, ya que compromete la prevención, el control y la terapia de las enfermedades infecciosas (García, 2007).

Las bacterias son microorganismos unicelulares que representan a los organismos más abundantes del planeta, miden algunos micrómetros de largo (entre 0.5 y 5 μm) y se presentan en muchas formas incluyendo esferas, barras, y espirales. Generalmente poseen una pared celular similar a la de plantas u hongos, debido a esta característica son clasificadas en Gram positivas y Gram negativas (Berkow and Fletcher, 1990).

Según Jawetz (1999) las bacterias están clasificadas en tres tipos fundamentales. Una de las variedades bacterianas es la familia de los cocos, dentro de la cual se encuentra el género *Staphylococcus* sp. Esta clase de bacterias poseen forma esférica y se agrupan formando grandes masas bacterianas en forma de racimo. Son del tipo conocido como Gram positivo.

Los estafilococos crecen fácilmente sobre casi todos los medios bacteriológicos y su crecimiento mejora bajo condiciones aeróbicas. Su mayor velocidad de crecimiento se da entre 15-25°C. Normalmente se encuentran en la cavidad nasal del 30% de los adultos sanos y en la piel del 20% de ellos. Los estafilococos son la variedad más virulenta de la familia de los cocos, y son responsables de un gran espectro de enfermedades dependientes de la producción de toxinas, las enfermedades van desde infecciones cutáneas, diarreas, vómitos y náuseas hasta neumonías (Berkow and Fletcher, 1990).

Sin embargo, la amenaza más grave para el humano es la insuficiencia cardiaca provocada por la especie *Staphylococcus aureus* debido a una endocarditis bacteriana. Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* son las más comunes y de larga historia pues esta especie muestra un nivel de resistencia a la penicilina, por lo que ha sido un importante reto para la comunidad científica descubrir nuevas alternativas para la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por esta clase de bacterias (Jawetz, 1999).

De acuerdo con el protocolo del Instituto de Ciencias la actividad antimicrobiana puede ser probada mediante varios métodos siempre y cuando estén debidamente acreditados por el Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos (NCCLS, de sus siglas en inglés). El método antimicrobial de disco de difusión es uno de los más comunes mundialmente, fue desarrollado en la década de los cuarentas. El método consiste en impregnar con disolución antibiótica los discos de difusión y colocarlos en una superficie con el medio apropiado que ha sido inoculado con una suspensión bacteriana pura. Terminada la incubación, las zonas de inhibición son medidas y clasificadas dentro de la categoría susceptible, intermedia o resistente (Jorgensen et al., 1999).

1.5 Perspectivas del estudio de las ascidias en Costa Rica

A pesar de que algunos de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de ascidias pueden servir como una alternativa en el tratamiento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos comerciales, es muy poco lo que se ha investigado respecto al efecto inhibitorio que podrían presentar los extractos de ascidias en presencia de bacterias patógenas, como es el caso de *Staphylococcus aureus* y hongos como *Geotrichum candidum*. En el caso de *Geotrichum candidum* es un hongo de la clase Ascomycetes, ampliamente distribuido en el medio ambiente en suelo, flores y hojas de un alto espectro de cultivos, especialmente en zonas tropicales. Puede presentarse en la piel y membranas mucosas del ser humano (Kiraz et al., 2000).

Según el estudio de mortalidad por enfermedades de declaración obligatoria realizado por la Unidad de Información Estadística del Ministerio de Salud de Costa Rica, 2385 costarricenses murieron durante el año 2005 por enfermedades causadas por microorganismos.

La resistencia a antibióticos es un problema importante de salud pública a nivel mundial, ya que conlleva a un incremento en la morbilidad y mortalidad provocadas por enfermedades infecciosas y por lo tanto a la necesidad de recurrir a tratamientos más novedosos, costosos y prolongados, lo anterior ocasiona un aumento significativo del gasto en salud del Estado Costarricense (García, 2007). Es por esta razón que se recurre a la investigación de nuevos compuestos con actividad antibiótica que resulten más eficaces contra los patógenos causantes de dichas enfermedades.

Costa Rica comprende alrededor de 1400 km de litoral, de los cuales más de 1000 corresponden a la costa Pacífica, la cual posee una gran cantidad de golfos, esteros, estuarios, acantilados, puntas, sectores rectilíneos y bahías que son la base física de una gran producción biológica en el lugar. Sin embargo, no se ha realizado un inventario completo de los recursos marinos de la zona, de ahí que exista un déficit de información acerca de los diversos tipos de actividad biológica y de caracterización química que pueden presentar muchos organismos invertebrados marinos, como las ascidias, en particular las especies presentes en Costa Rica (INBio, 2007).

Si se parte de los resultados obtenidos a través de las investigaciones realizadas, donde se han obtenido numerosos compuestos activos y de interés industrial que son la base para síntesis y formulaciones de drogas eficaces para el tratamiento de enfermedades con énfasis en aplicaciones de salud humana, es posible dirigir los estudios hacia la aplicación antibacteriana de las ascidias en el control de plagas bacterianas y fúngicas. En un primer esfuerzo por caracterizar químicamente los metabolitos presentes en estos organismos es preciso conocer previamente la naturaleza química de los compuestos dentro de los extractos activos (Mohn et al., 2002).

En este contexto y considerando los aportes internacionales con respecto a trabajos realizados con la clase biológica Ascidiacea como fuente de productos químicos bioactivos, la Universidad Nacional de Costa Rica inició en el año 2004 una línea de investigación definida dentro del Proyecto FIDA como “Determinación de actividades farmacológicas y elucidación de estructuras químicas en los macroinvertebrados (esponjas y corales blandos) y urocordado (ascidias) en algunas zonas del Pacífico y Caribe de Costa Rica”, con el afán de conocer la taxonomía, distribución y ecología de las especies de ascidias de Costa Rica (Pacífico Norte y Gandoca-Manzanillo) así como también su composición química y potencial aprovechable. Dicho proyecto está dirigido por las Escuelas de Ciencias Biológicas, Química y Ciencias Agrarias de

la Universidad Nacional junto con colaboradores internacionales de la Universidad de Puerto Rico y del Instituto de Oceanología de Cuba.

La detección de algún tipo de actividad biológica en ascidias del Pacífico de Costa Rica resulta importante, ya que permitirá la posterior evaluación del potencial antimicrobiano, y la caracterización química de sus metabolitos abre la posibilidad de concretar la incursión para el inicio de una línea de investigación en la biotecnología marina tan indispensable en nuestras latitudes por ser países tropicales con un gran potencial de riqueza todavía sin explotar, disponiendo esta información para dirigir estudios hacia la aplicación en la industria farmacéutica e industrial y aumentar la calidad de la salud y vida humana. Por lo anteriormente expuesto, se propone el proyecto de investigación titulado “Caracterización química de metabolitos aislados en un extracto con actividad antimicrobiana y antifúngica de la ascidia *Rhopalaea* sp. proveniente del área de Cuajiniquil, Guanacaste, Costa Rica”, lo cual permitirá poder evaluar su potencial antibiótico y realizar un diagnóstico sobre la química alrededor de esta especie.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo General

Caracterizar cualitativamente la naturaleza química de los compuestos aislados del extracto o fracción de la ascidia *Rhopalaea* sp. que presente la mayor actividad antimicrobiana contra los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Geotrichum candidum*.

1.6.2 Objetivos Específicos

1.6.2.1 Establecer un protocolo para la metodología que permita la recuperación de extractos con actividad antibiótica.

1.6.2.2 Establecer un protocolo para separar los compuestos principales presentes en el extracto de ascidias *Rhopalaea* sp. que presente la mayor actividad contra los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Geotrichum candidum*, mediante métodos cromatográficos.

1.6.2.3 Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos y realizar un estudio comparativo entre la actividad antimicrobiana de los extractos de ascidias *Rhopalaea* sp. y la de un fármaco comercial, contra los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Geotrichum candidum*.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Recolección de las ascidias

Las ascidias del género *Rhopalaea* sp. fueron recolectadas manualmente mediante SCUBA entre 2 y 15 m de profundidad en la zona Pacífico Norte de Costa Rica, específicamente en el área de Cuajiniquil, Latitud 10° 0' 57.74" (N), Longitud -85° 44' 12.29" (O). Fueron reconocidas tomando como base las características físicas de dicho género descritas por Carballo (2006) y bajo la asesoría del MSc. Rigoberto Viquez, biólogo marino de la Escuela de Biología de la UNA. Estas fueron colectadas en la zona de Cuajiniquil en la provincia de Guanacaste, zona del Pacífico Norte de Costa Rica, entre los meses de diciembre del 2007 y marzo del 2008 correspondientes a la época seca del lugar y bajo un muestreo irrestricto aleatorio (Figura 2.1).



Figura 2.1. Lugar de recolección de *Rhopalaea* sp.

2.2 Equipos y reactivos

2.2.1 Equipo

- Centrífuga IEC Multi RF Modelo 120 de 60 Hz.
- Espectrómetro NMR Bruker Avance Multinuclear de 500MHz.
- FT-IR Modelo Bruker IFS 66 v/S.
- GC-MS Hewlett-Packard GC System 6890 Series, Hewlett-Packard Mass Selective Detector 5973.
- HPLC Agilent 1100 Series Diode Array coupled MS Bruker Daltonics 6000, Electrospray API-ES con columna Supelcosil LC-NH₂ de 25 cm x 4.6 mm, de 5 µm de tamaño de partícula.

2.2.2 Reactivos

- Acetona p.a. J. T. Baker 9006-03
- Agar papa dextrosa Merck 0130
- Agar Staphylococcus #110 Merck 3420
- Cloroformo p.a. Merck 2445
- Cromatofolios de gel de sílice Merck 5554
- Deuterocloroformo Merck 3420
- Etanol al 95% FNL
- Formaldehído Merck 4025
- Hexano p.a. J. T. Baker 9309-03
- Metanol Merck 6009
- Nitrógeno Praxair 99.99%
- Gel de Sílice Mallinckrodt type 60A special 100-200 mesh
- Tetrahidrofurano p.a. Merck 9731

2.3 Metodología

2.3.1 Tratamiento de la muestra

El material se limpió con agua de mar para eliminar la arena y organismos epífitos. Posteriormente se separó por géneros y se colocó en bolsas de propileno transparentes a las cuales se les drenó el exceso de agua por gravedad y se congelaron para su transporte para evitar su descomposición, la pérdida de metabolitos y su actividad, según Caccamese et al. (1980) y Rao and Parekh (1981).

En el laboratorio, se procedió a conservar una parte de cada muestra en formol glicerinado al 10% para su posterior confirmación taxonómica con la guía de Van Name (1945). El resto de la misma, se lavó con agua destilada y se limpió de epífitos bajo el microscopio de disección. El exceso de agua se eliminó al colocar las muestras sobre papel absorbente por un día (Pesando and Caram, 1984).

2.3.2 Método de obtención de extractos crudos

Se pesaron aproximadamente 100 g de material semihúmedo los cuales se trituraron con un mortero. Posteriormente se maceraron a temperatura ambiente con 300 mL del disolvente a utilizar (acetona y etanol al 95%) durante 72 horas con agitación ocasional. Cada uno de los extractos antes de ser centrifugados se filtraron al vacío mediante un embudo Büchner utilizando un papel de filtro Whatman #1. El extracto remanente se centrifugó a 3400 r.p.m. (1000xg) durante 15 min para eliminar cualquier residuo sólido no retenido en el filtro (Sreenivasa and Parekh, 1981). El sobrenadante se concentró al vacío en un evaporador rotatorio modelo R-110 Büchi a una temperatura máxima de 35 °C, hasta obtener un extracto con consistencia viscosa. Las trazas de agua se separaron por gravedad (decantación) y los cristales obtenidos se suspendieron en 10 mL del disolvente de extracción (Wahl et al., 1994).

2.3.3 Bioensayos

Las pruebas se llevaron a cabo por quintuplicado en cajas de Petri desechables estériles, a las que se les agregó 15 mL del medio de cultivo Agar Staphylococcus #110, inoculado con 0.1 mL de la cepa de *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) y se utilizó 15 mL de Agar Papa Dextrosa para el inóculo del hongo *Geotrichum candidum* (Fungi), dejando solidificar el medio a temperatura ambiente. Las cepas fueron proporcionadas por el MSc. Germán Rivera del Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias y por el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional (Heredia, Costa Rica). Los discos utilizados para inocular el extracto se diseñaron a partir de papel de filtro Whatman No. 42, de 6 mm de diámetro. Se cargaron asépticamente con 0.1 mL de los extractos, dejando evaporar el disolvente e inmediatamente después se colocaron en los medios de cultivo más un blanco con el disolvente de extracción como control negativo.

Las cajas se dejaron incubando a 37 °C durante 48 horas en un cuarto estéril. Posteriormente, se midieron los halos de inhibición con un vernier (De Lara-Isassi et al., 1996). También se utilizó como patrón de referencia el fármaco comercial “Keflex” (cefalosporina) recomendado por la Caja Costarricense de Seguro Social de Costa Rica para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por el patógeno *Staphylococcus aureus* y Miconazol Nitrato[®] al 2 %, antifúngico comercial de alto espectro contra el hongo *Geotrichum candidum*. Estos bioensayos representarán el control positivo empleando la metodología expuesta anteriormente.

Con base en los resultados que se obtuvieron en el bioensayo, fue seleccionado el disolvente del extracto que presentó el mayor halo de inhibición promedio. A este se le aplicó la misma metodología para la obtención del extracto crudo descrita en la sección 2.3.2 variando la cantidad de material en aproximadamente 1500 g y utilizando 2500 mL del disolvente de extracción a temperatura ambiente durante 72 horas. La maceración se repitió tres veces con la misma cantidad de acetona y todos los cristales obtenidos se suspendieron en 50 mL del disolvente de extracción.

2.3.4 Purificación del metabolito

2.3.4.1 Separación cromatográfica del extracto

El extracto crudo se analizó por cromatografía de capa fina, usando como fase estacionaria gel de sílice y fases móviles de mezclas de disolventes de hexano/acetato de etilo: (9:1), (7:3) y (6:4). Además se ensayó con hexano puro y mezclas de hexano/THF: (1:1), (4:6) y (3:7). En todos los casos se utilizaron reveladores de vainillina en H₂SO₄, cloruro de hierro III al 1% y vapores de amoníaco. Una vez escogida la fase móvil, el extracto se purificó empleando cromatografía de columna de gel de sílice con hexano y acetato de etilo como fase móvil. La muestra proveniente del residuo acetónico se depositó en la parte superior de la columna y se empezó la separación con una fase móvil de hexano, aumentando la polaridad paulatinamente con mezclas hexano/acetato de etilo: (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (1:1), (4:6), (3:7), (2:8), (1:9) y finalizando con acetato de etilo puro. Se recolectaron 57 fracciones. Las fracciones fueron analizadas comparativamente en cromatografía de capa fina en gel de sílice, utilizando lámpara ultravioleta y luego revelando con vainillina. Finalmente, por las similitudes en el Índice de Retención (R_f) de la cromatografía de capa fina, se reunieron 13 fracciones.

A las fracciones se les realizó una cromatografía de capa fina en gel de sílice utilizando como fase móvil hexano/acetato de etilo 6:4. Posteriormente a cada una de estas fracciones se les realizó el bioensayo descrito en la sección 2.3.3 para determinar la actividad inhibidora en el crecimiento de la bacteria y el hongo. La fracción que presentó la actividad fue fraccionada nuevamente con una cromatografía de columna de menor diámetro y mayor longitud con gel de sílice como fase estacionaria y hexano y THF como fase móvil. La fracción activa fue depositada en la columna y la separación se realizó empezando con hexano como fase móvil, aumentando la polaridad con mezclas de hexano/THF: (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (1:1), (4:6), (3:7), (2:8), (1:9) y finalizando con THF puro. Se recolectaron 22 fracciones que fueron analizadas comparativamente en cromatografía de capa fina en gel de sílice, utilizando lámpara ultravioleta y luego revelando con vainillina. Finalmente, por similitudes en el R_f , se reunieron 5 fracciones.

A estas últimas se les realizó una extracción en fase sólida con fase normal (sílice) utilizando hexano para lavar de impurezas y luego separando con cloroformo, acetona y etanol. Las fracciones fueron analizadas comparativamente en cromatografía de capa fina en gel de sílice, utilizando lámpara ultravioleta y luego revelando con vainillina. Finalmente, se reunieron 5 fracciones, una proveniente de cada una de las anteriores en la separación con acetona.

2.3.4.2 Condiciones del método cromatográfico a través de la técnica de HPLC

Se utilizó el Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Agilent 1100 Series con Detector de Arreglo de Diodos (DAD), equipado con un detector MS/MS Bruker Esquire 6000. La identificación de la cantidad de metabolitos contenidos en las fracciones purificadas se realizó en una columna analítica Supelcosil LC-NH₂ de 25 cm x 4.6 mm, 5 µm. Se utilizó como fase móvil isocrática metanol/H₂O 50:50. El análisis se llevó a cabo a una longitud de onda de 254 nm y 280 nm, con un tiempo de operación de 10 minutos a un flujo de 1.0 mL/min (Cuadro 2.1). Los disolventes empleados en la fase móvil fueron filtrados a través de filtros de membrana de 0.45 µm en cada uno de los análisis.

Cuadro 2.1. Condiciones cromatográficas empleadas para analizar los compuestos de la fracción 4 mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Variable Cromatográfica	Valor o Tipo
Volumen de inyección	5 µm
Flujo de fase móvil	1.0 mL/min
Columna cromatográfica	Supelcosil LC-NH ₂ 25 cm x 4.6 mm, 5 µm
Tiempo empleado en el análisis	10 min
Detector	DAD
Longitud de onda (λ)	254 y 280 nm

2.3.5 Análisis espectroscópico.

2.3.5.1 Ultravioleta-Visible (UV-Visible).

El espectro UV-Visible se obtuvo directamente en el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) con el Agilent 1100 Series con Detector de Arreglo de Diodos (DAD). Se realizó desde una longitud de onda de 200 a 800 nm. El compuesto previamente se disolvió en metanol para este análisis.

2.3.5.2 Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro FT-IR de los compuestos aislados fue obtenido a partir de un equipo Bruker Modelo IFS 66 v/S, midiendo el porcentaje de transmitancia contra su número de onda desde 3600 a 600 cm^{-1} en una pastilla de KBr.

2.3.5.3 Espectrometría de masas

El espectro de masas se obtuvo con un MS/MS Bruker Esquire 6000 Electrospray API-ES a través de inyección directa en modo positivo (Cuadro 2.2). En adición se utilizó un espectrómetro de masas acoplado a un GC para el compuesto 01 con un Hewlett-Packard GC System HP 6890 Series con Hewlett-Packard Mass Selective Detector 5973 de ionización electrónica.

Cuadro 2.2. Condiciones del espectrómetro de masas Bruker Esquire 6000 Electrospray API-ES empleadas para analizar los compuestos de la fracción 4

Ion Source Type	ESI	Skim 1	40.0 Volt
Mass Range Mode	Std/Normal	Averages	5 Spectra
Capillary Exit	205.2 Volt	Alternating Ion Polarity	Off
Accumulation Time	51025 μ s	Scan End	200 and 300 m/z
Ion Polarity	Positive	Trap Drive	122.3
Scan Begin	50 m/z	Auto MS/MS	Off

2.3.5.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN se obtuvieron con un equipo Bruker Avance de 500 MHz. La muestra 01 fue disuelta en deuterocloroformo y la 02 en dimetil sulfóxido deuterado.

3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Actividad antibacterial

El extracto crudo de acetona de la ascidia *Rhopalaea* sp. presentó la mayor actividad positiva contra el hongo *Geotrichum candidum* mostrando un radio de inhibición promedio de 14.5 ± 0.5 mm, mientras que contra la bacteria *Staphylococcus aureus* se obtuvo un radio de inhibición promedio de 13.5 ± 0.5 mm (Foto 2), considerándose en ambos casos una inhibición intermedia, ya que se encuentra entre el rango de 13 – 17 mm. La inhibición del bactericida comercial cloranfenicol fue de 20.0 ± 0.5 mm, lo cual concuerda con los datos reportados según García (2001).

El extracto crudo de etanol de *Rhopalaea* sp. presentó actividad solamente contra el hongo *Geotrichum candidum* presentando un radio de inhibición promedio de 2.5 ± 0.5 mm, considerándose en este caso una inhibición leve, ya que se encuentra entre el rango de 2-13 mm. Contrario a estos resultados anteriores, el efecto contra *Staphylococcus aureus* fue prácticamente nulo, el extracto etanólico no mostró ninguna actividad. El Miconazol Nitrato al 2% mostró un radio de inhibición promedio de 15.0 ± 0.5 mm contra el hongo *Geotrichum candidum* (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Actividad antibiótica de extractos de la ascidia *Rhopalaea* sp. de la costa del Pacífico de Costa Rica contra *Staphylococcus aureus* y *Geotrichum candidum*

Especie	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Geotrichum candidum</i>	
	Extracto etanólico (± 0.5 mm)	Extracto acetónico (± 0.5 mm)	Extracto etanólico (± 0.5 mm)	Extracto acetónico (± 0.5 mm)
<i>Rhopalaea</i> sp.	0.0	13.5	2.5	14.5
Cloranfenicol	20.0		NA	
Miconazol Nitrato 2%	NA		15.0	

*NA = No Aplica

De las 13 fracciones recolectadas del extracto de acetona de la cromatografía de columna, las número 3, 4 y 5 fueron las que presentaron inhibición contra *Staphylococcus aureus*. De estas tres fracciones, la 3 y 4 presentaron un área de inhibición de 20.0 ± 0.5 mm y la 5 de 16.0 ± 0.5 mm, demostrando resultados de una fuerte inhibición comparándose con el bactericida cloranfenicol que presentó una inhibición de 20.0 ± 0.5 mm. En todos los casos se utilizó un control negativo de acetona como se muestra en la Foto 4, el cual no presentó inhibición en ninguno de los ensayos realizados.

Los resultados de inhibición obtenidos concuerdan con la bibliografía consultada, como lo reporta Hooper (1995) el cual comprobó actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus* de la ascidia *Pseudodistoma* sp., Liu et al. (2005) reportaron el compuesto lissoclibadin 1 aislado de la especie *Lissoclinum* cf. *badium* con actividad antibacterial. El metabolito styelins A-E aislado de la ascidia solitaria *Styela clava*, mostró actividad inhibitoria contra bacterias que son patógenos humanos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, según Lehrer et al. (2003). Además Makawva et al. (1995) reportaron de la ascidia *Polycitor* sp. potentes actividades inhibitorias contra patógenos humanos como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

Los resultados con el mayor efecto de inhibición fueron mayores en el extracto de acetona comparado con el etanol, en ambos organismos. Esto indica que los metabolitos responsables de la misma son solubles en este disolvente, lo que concuerda con los resultados de Sreenivasa and Parekh (1981); Vidyavathi and Sridhar (1991) y De Lara-Issasi y Ponce (1991), quienes encontraron que para organismos marinos en los bioensayos realizados utilizando acetona como disolvente de extracción siempre mostraron una mejor respuesta antibiótica en general, que los efectuados con etanol u otro disolvente de mayor polaridad.

3.2 Purificación y aislamiento de los metabolitos

Después de confirmada la actividad antibacterial de las fracciones aisladas se procedió a trabajar en el proceso de purificación con la fracción 4 mediante la cromatografía de columna, y extracción en fase sólida. Posterior a estos pasos se procedió a su aislamiento y purificación mediante HPLC. La identificación de la pureza se llevó a cabo a una longitud de onda de 258 y 280 nm comprobando mediante el detector de arreglo de diodos que se lograron aislar dos metabolitos en forma pura. Como se puede observar en el cromatograma de la Figura 3.1 el compuesto 01 de la fracción 4 muestra un tiempo de retención de 5.640 minutos y el cromatograma de la Figura 3.2 del compuesto 02 de la misma fracción presenta un tiempo de retención de 6.769 minutos bajo las condiciones cromatográficas indicadas en el cuadro 2.1.

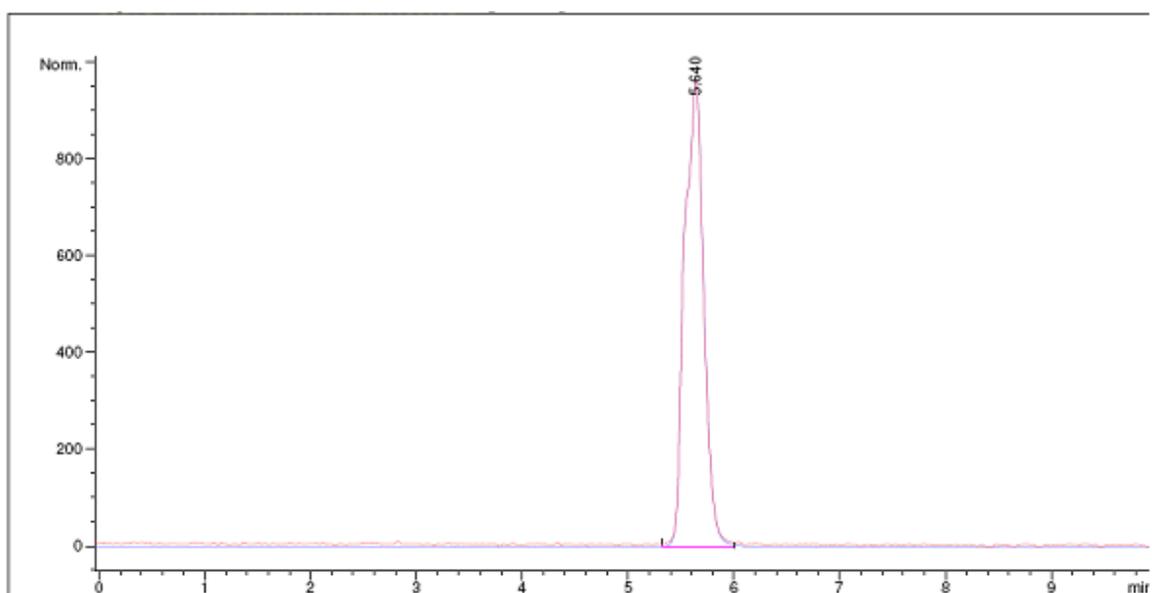


Figura 3.1. Cromatograma del compuesto 01 purificado y aislado de la fracción 4 de la ascidia *Rhopalaea* sp. mediante HPLC a una longitud de onda de 258 y 280 nm con una columna analítica Supelcosil LC-NH₂ de 25 cm x 4.6 mm, de 5 µm utilizando como disolvente una mezcla isocrática de metanol/H₂O 50:50

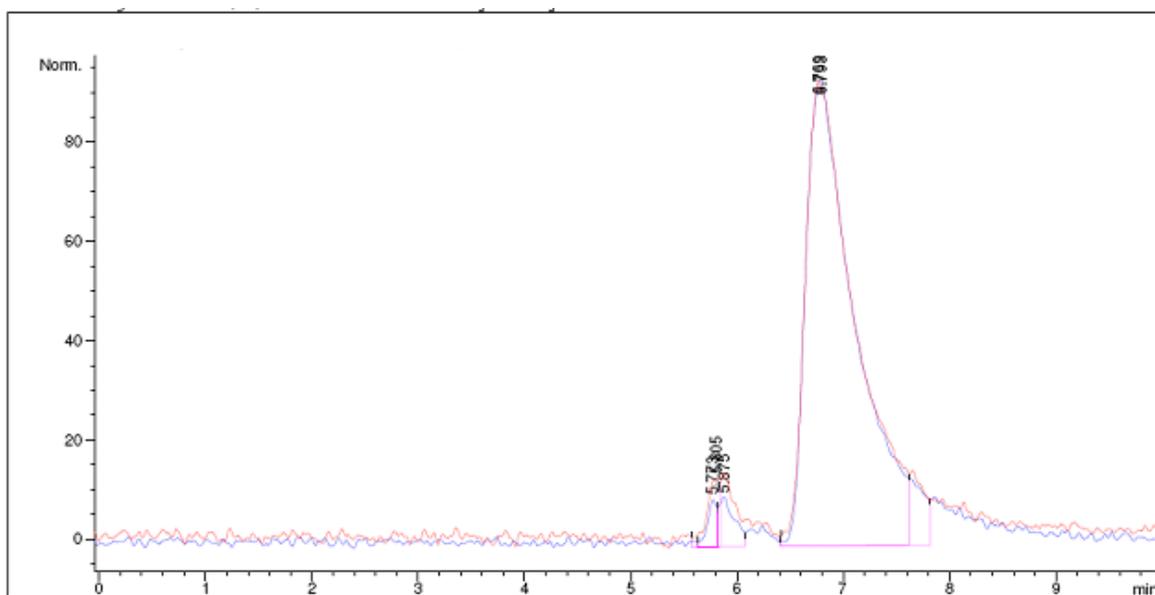


Figura 3.2. Cromatograma del compuesto 02 purificado y aislado de la fracción 4 de la ascidia *Rhopalaea* sp. mediante HPLC a una longitud de onda de 258 y 280 nm con una columna analítica Supelcosil LC-NH₂ de 25 cm x 4.6 mm, de 5 μm utilizando como disolvente una mezcla isocrática de metanol/H₂O 50:50

3.3 Análisis espectroscópico de los metabolitos aislados

3.3.1 Compuesto 01

3.3.1.1 Ultravioleta-Visible

El espectro UV-Visible del compuesto aislado y purificado (Figura 3.3), presenta dos bandas máximas de absorción alrededor de 220 nm y 290 nm (Cuadro 3.2), las cuales son longitudes de onda características de compuestos heterocíclicos de anillos aromáticos unidos a oxígeno; por su sistema de conjugación permite que se lleven a cabo transiciones de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ y tipo $n \rightarrow \pi^*$ y haya un desplazamiento batocrómico de las bandas. (Silverstein et al., 1991). Una absorción a 210 nm se debe a la transición de $\pi \rightarrow \pi^*$ característico de los anillos aromáticos ya que su banda de absorción primaria absorbe a una longitud de onda cercana a 200 nm (Pavia et al., 2001; Silverstein et al., 1991). No se muestra absorción en la región visible, lo que es consistente con la transparencia del compuesto obtenido.

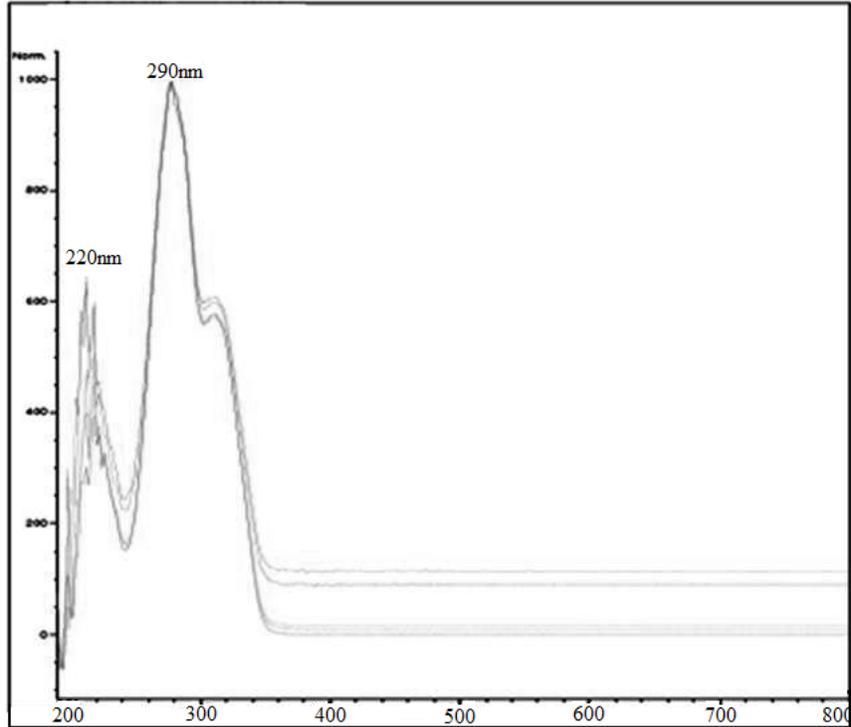


Figura 3.3. Espectro UV-Visible del compuesto 01 de la ascidia *Rhopalaea* sp. obtenido de su fracción 4 en el HPLC Agilent 1100 Series con Arreglo de Diodos utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de metanol/H₂O 50:50

Cuadro 3.2. Datos de máximas absorbancias obtenidas en el espectro UV-Visible del compuesto 01 de la ascidia *Rhopalaea* sp.

Longitud de onda (λ)	Absorbancia
220 nm	0.450
290 nm	1.000

3.3.1.2 Infrarrojo con Transformada de Fourier

El espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) del compuesto (Figura 3.4), no presenta bandas importantes en la región de $3500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ descartando la presencia de enlaces de O-H (Pavia et al., 2001). El alargamiento de los dobles enlaces de anillo aromático está representado por las señales en la región de 1610 cm^{-1} y 1465 cm^{-1} . La banda pequeña alrededor de 3000 cm^{-1} se presenta debido al estiramiento del enlace C-H de los carbonos con hibridación sp^2 pertenecientes al anillo aromático y los que conforman un alqueno fuera de este anillo. La banda cerca a 1740 cm^{-1} representa una banda característica de carbonilo debido al estiramiento C=O. Las bandas larga e intensa alrededor de 830 cm^{-1} es típica de la configuración cis de un alqueno (Pavia et al., 2001).

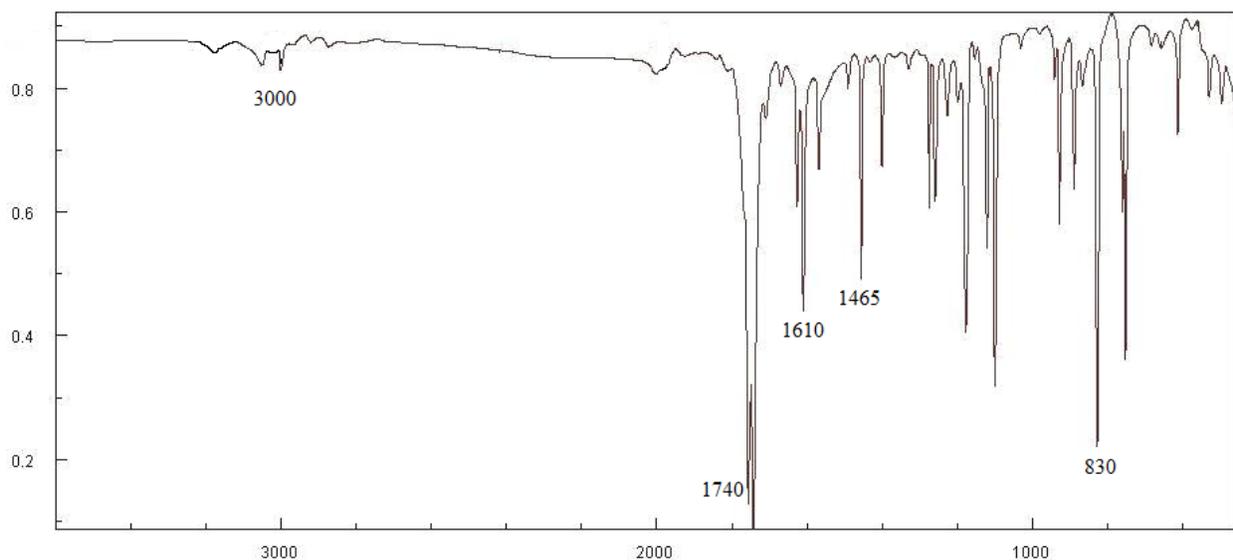


Figura 3.4. Espectro infrarrojo del compuesto 01 de la ascidia *Rhopalaea* sp. analizado en el equipo Bruker Modelo IFS 66 v/S en una pastilla de KBr

3.3.1.3 Espectrometría de masas.

Como se observa en la Figura 3.5 el espectro de masas presenta un pico base en 147 m/z y las razones isotópicas de su $x+1$ y $x+2$ se presentan en el cuadro 3.3. Con la información de estas razones isotópicas se puede obtener una fórmula molecular experimental de $C_9H_6O_2$. Las aportaciones de sus átomos se resumen en el cuadro 3.3.

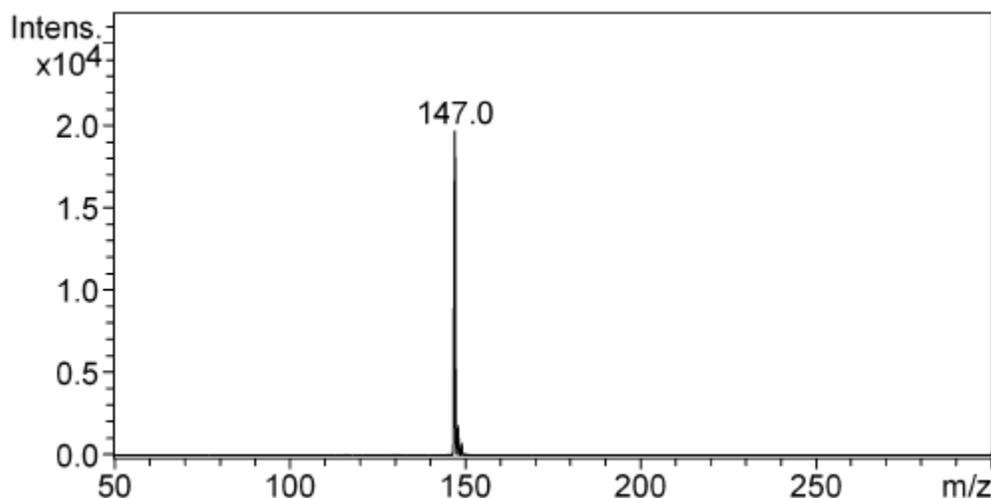


Figura 3.5. Espectro de masas del compuesto 01 de la ascidia *Rhopalaea* sp. realizado en un MS/MS Bruker Esquire 6000 con ionización de electrospray en modo positivo.

Cuadro 3.3. Señales del espectro de masas y relación isotópica de los picos correspondientes al ion molecular del compuesto 01 de la ascidia *Rhopalacea* sp.

Masa	Intensidad	9 C	2 O
147,0	100.0		
148,0	9.97	9.90	0.08
149,0	1.9	0.49	0.40

El espectro de masas obtenido por ionización electrónica en el GC-MS presenta un pico base en 118 m/z y un ión molecular (M^*) en 146 m/z (Figura 3.6 B), lo que confirma la masa molecular obtenida por electrospray en el LC/MS/MS. El ión molecular confirma también la fórmula molecular del compuesto ($C_9H_6O_2$), y la alta intensidad de este ion molecular propone una estructura estable en el compuesto aislado, propia de compuestos aromáticos y con resonancia (Pavia et al., 2001). El patrón de fragmentación de la molécula es muy similar (81%) a la 2H-1-Benzopyran-2-ona, según la información de la biblioteca del MS utilizado (Figura 3.6 C y D).

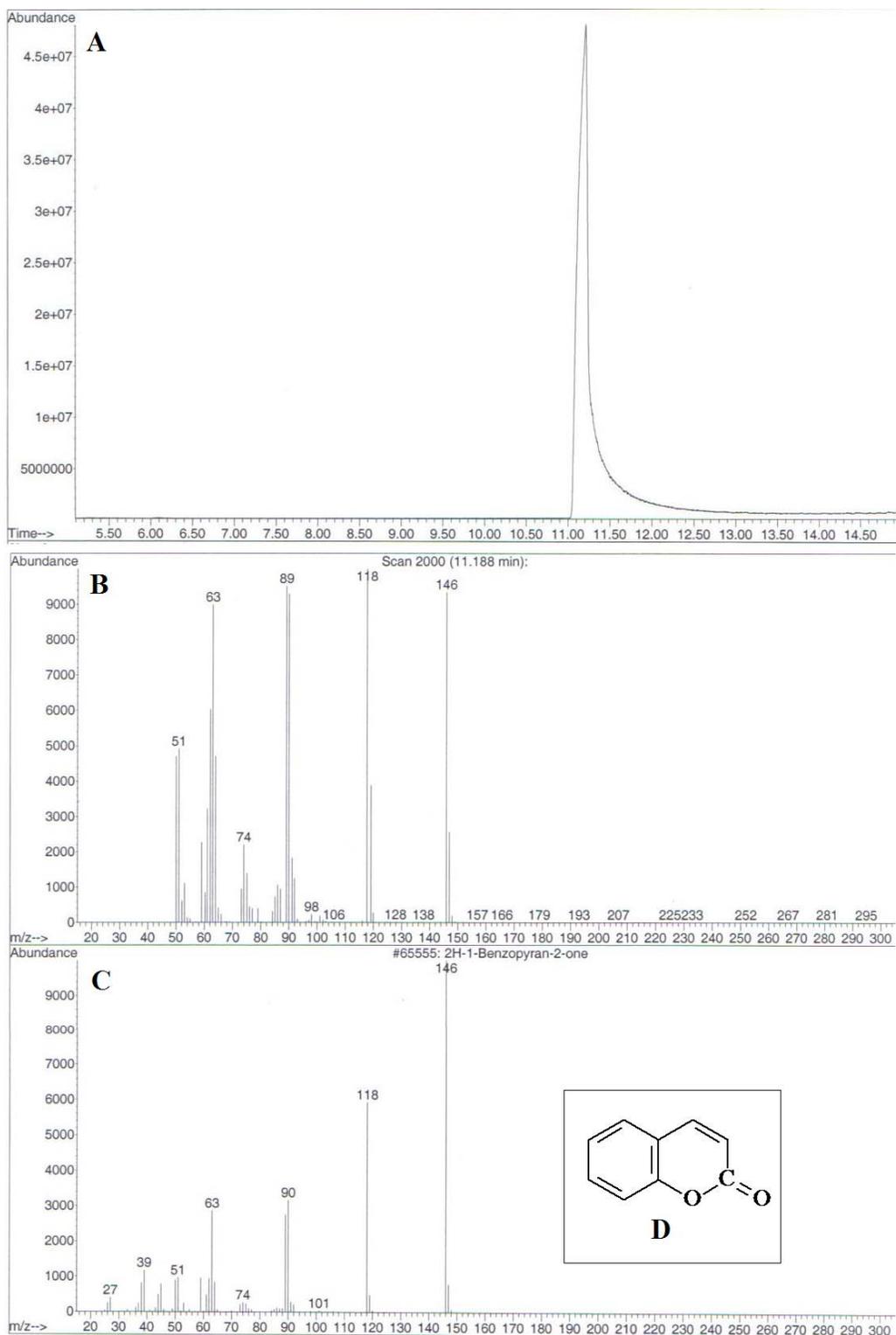


Figura 3.6. Cromatograma (A) y espectro de masas (B) del compuesto 01 purificado y aislado de la fracción 4 de la ascidia *Rhopalaea* sp. obtenido mediante GC-MS con ionización electrónica y espectro de masas (C) de la 2H-1-Benzopyran-2-ona (D)

3.3.1.4. Resonancia Magnética Nuclear

3.3.1.4.1. ^{13}C RMN

El análisis de este espectro (500 MHz) (Figura 3.7) confirma la fórmula molecular sugerida por el análisis de masas al presentar 9 señales para carbono (Cuadro 3.4), y varias de ellas a campo bajo: la primera de 160.77 ppm es un valor característico de un carbono perteneciente a un grupo carbonilo de ésteres. Este grupo funcional confirma la volatilidad del compuesto en el análisis de cromatografía de gases, debido a que son compuestos no participan como dadores de hidrógeno en puentes de hidrógeno. Esta falta de capacidad ocasiona que no se formen puentes de hidrógeno entre moléculas de ésteres, lo que los hace más volátiles que un ácido o un alcohol de similar peso molecular (Merck et al., 2001). Las señales de 154.05 ppm, 143.47 ppm, 131.84 ppm, 127.90 ppm, 124.44 ppm y 118.85 ppm corresponden a valores característicos para los carbonos de un anillo aromático. Aunque también las señales de 116.87 ppm y 116.68 ppm se encuentran en el rango de aromaticidad para carbonos, estas podrían corresponder a los valores de carbonos formando un doble enlace en un alqueno. La presencia de un grupo carbonilo y un oxígeno en la estructura sugiere un desplazamiento hacia campo bajo en aquellos carbonos que estén directamente unidos a este grupo y átomo (Pavia et al., 2001). La señal que sobresale alrededor de 75 ppm corresponde al disolvente CDCl_3 .

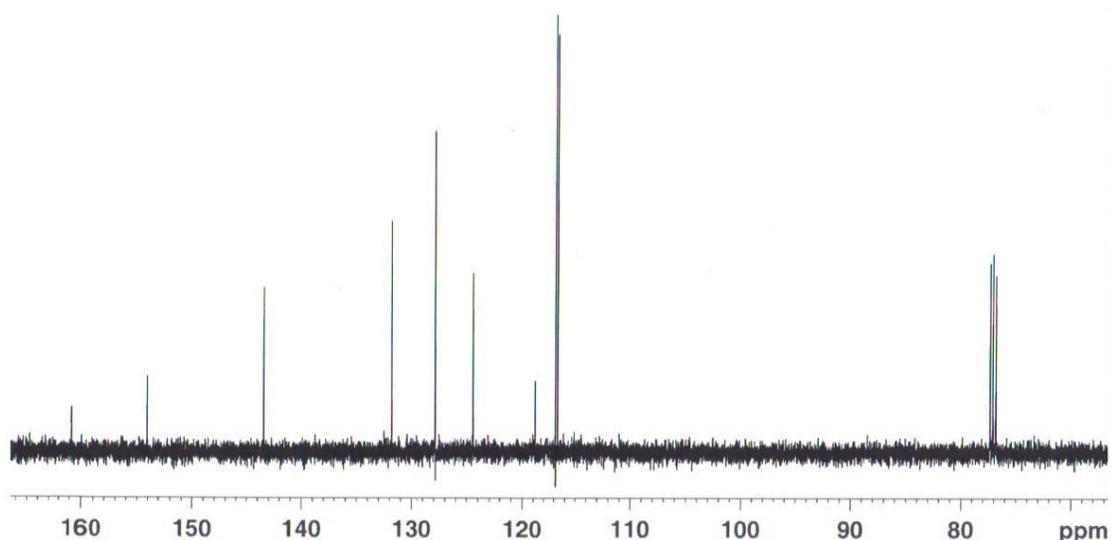


Figura 3.7. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 01 de la ascidia *Rhopalaea* sp. disuelto en CDCl_3 , realizado en un NMR Bruker Avance de 500 MHz

Cuadro 3.4. Desplazamientos de cada uno de los carbonos en el espectro de ^{13}C RMN para el compuesto 01 de la ascidia *Rhopalacea* sp.

# de ^{13}C	ppm
1	160.77
2	154.05
3	143.47
4	131.84
5	127.90
6	124.44
7	118.85
8	116.87
9	116.63

3.3.1.4.2. ^1H RMN

Las señales mostradas por el espectro de ^{13}C -RMN son consistentes con el espectro de ^1H -RMN. El análisis del espectro de ^1H -RMN (500 MHz) (Figura 3.8), muestra varias señales a campo bajo: entre δ 7.49-7.55 (2H) y δ 7.27-7.34 (2H) son señales características de los hidrógenos unidos a un anillo aromático, los cuales son desapantallados por el campo anisotrópico generado por los electrones en el sistema π del anillo (Pavia et al., 2001). Los desdoblamiento principales muestran un triplete y un doblete para cada uno de los grupos de señales, indicando una sustitución orto en el anillo. La constante de acoplamiento ($^3J=8.51$ Hz) confirma las posiciones orto entre hidrógenos. El agrandamiento de las señales muestra un desdoblamiento más complejo de segundo orden, usual en anillos sustituidos (Pavia et al., 2001).

Una señal en δ 7.73 (d, 1H) es atribuida a un hidrógeno que acopla con el otro hidrógeno vecino (señal en δ 6.43 (d, 1H)) correspondiente a un alqueno con sus hidrógenos en posición cis ($^3J=9.58$ Hz) perteneciente a un anillo anexo al anillo aromático de la molécula. El desplazamiento a campo bajo del hidrógeno es debido al desapantallamiento por el campo anisotrópico del anillo y la resonancia que deslocaliza la densidad de electrones con el grupo carbonilo unido al alqueno y que cambia su hibridación (Pavia et al., 2001).

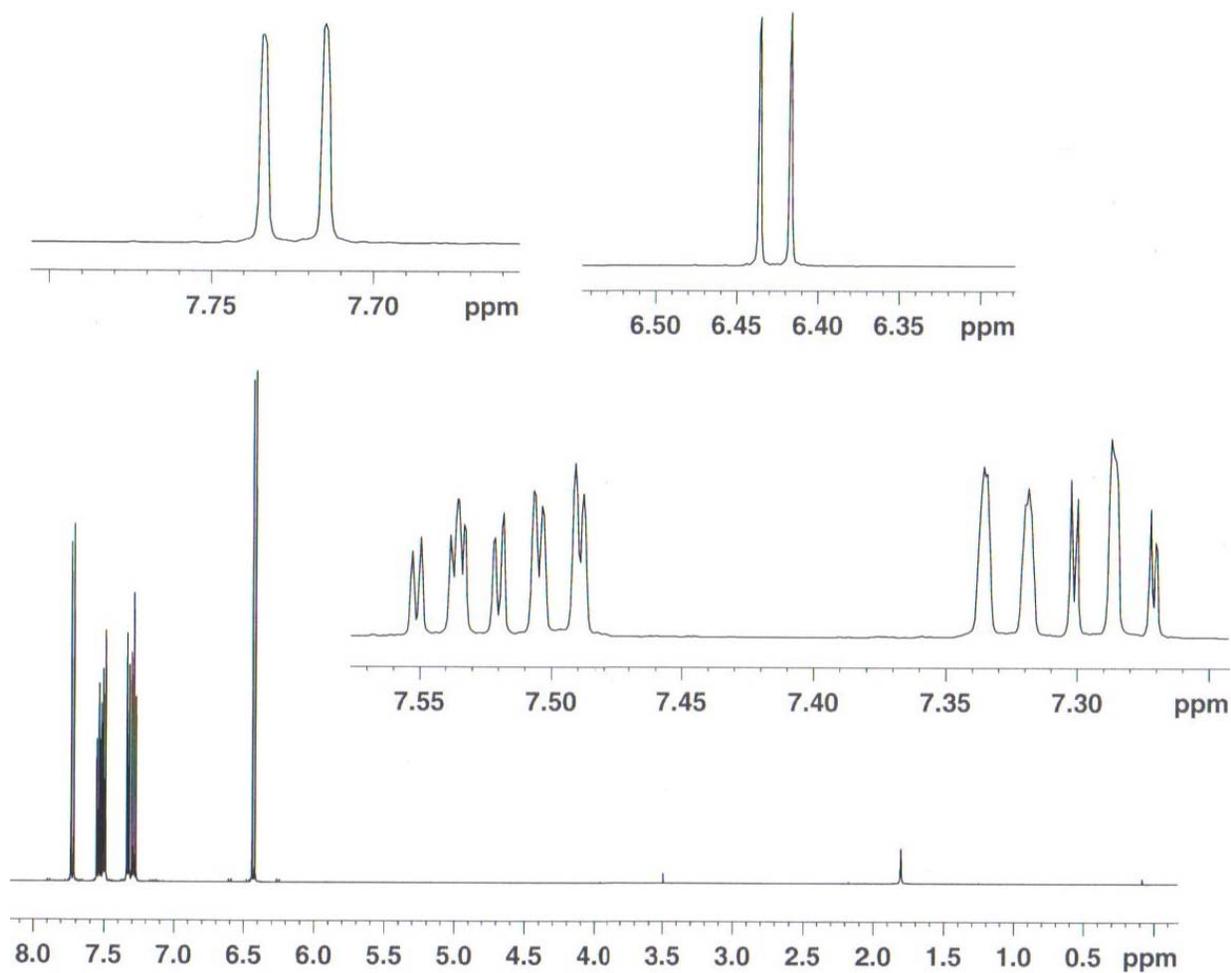


Figura 3.8. Espectro de ^1H RMN del compuesto 01 de la ascidia *Rhopalaea* sp. disuelto en CDCl_3 , realizado en un NMR Bruker Avance de 500 MHz

Cuadro 3.5. Desplazamientos de cada una de las señales del espectro de ^1H RMN para el compuesto 01 de la ascidia *Rhopalaea* sp.

# H	ppm	^3J (Hz)	Splitting	Integración
1	7.73	9.56	d	1 H
2	7.49-7.55	8.55	t-d	2 H
3	7.27-7.34	8.46	d-t	2 H
4	6.43	9.53	d	1 H

3.3.2 Compuesto 02

3.3.2.1 Ultravioleta-Visible

El espectro UV-Visible del compuesto aislado y purificado (Figura 3.9), presenta dos bandas máximas de absorción alrededor de 250 nm y 295 nm (Cuadro 3.6), las cuales son longitudes de onda características de compuestos heterocíclicos de anillos aromáticos unidos a oxígeno; por su sistema de conjugación permite que se lleven a cabo transiciones de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ y tipo $n \rightarrow \pi^*$. (Silverstein et al., 1991). Una absorción a 210 nm se debe a la transición de $\pi \rightarrow \pi^*$ característico de los anillos aromáticos ya que su banda de absorción primaria absorbe a una longitud de onda cercana a 200 nm (Pavia et al., 2001; Silverstein et al., 1991). Se muestra absorción en la región visible alrededor de 420 a 540 nm, lo que representa absorción de la luz color violeta, azul y azul-verdoso para reflejar el color anaranjado - rojo, lo que es consistente con el color del compuesto obtenido (Pavia et al., 2001).

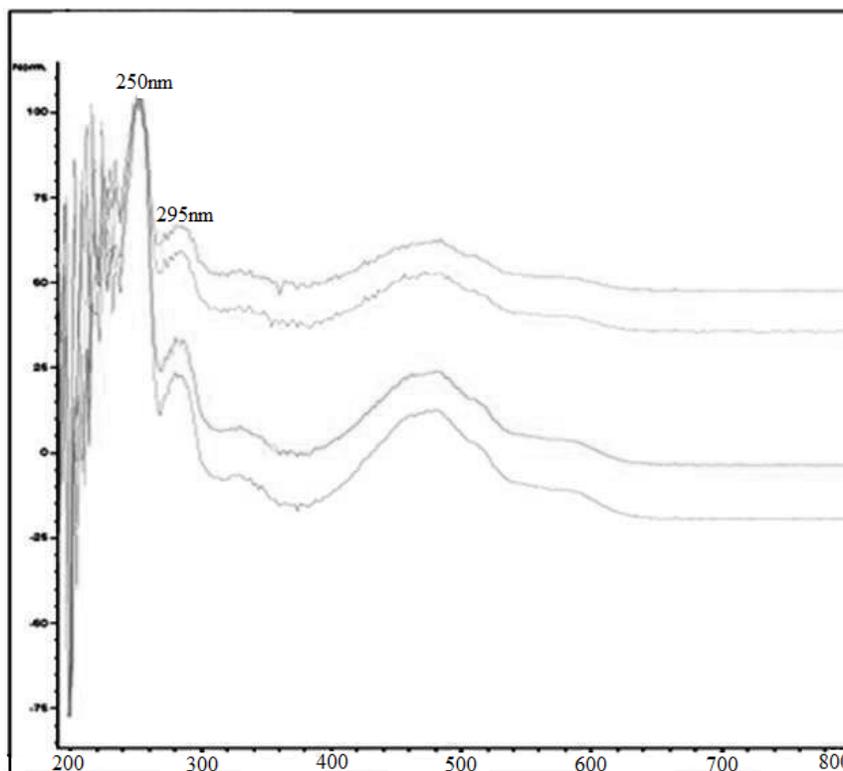


Figura 3.9. Espectro UV-Visible del compuesto 02 de la ascidia *Rhopalaea* sp. obtenido de su fracción 4 en el HPLC Agilent 1100 Series con Arreglo de Diodos utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de metanol/H₂O 50:50

Cuadro 3.6. Datos de máximas absorbancias obtenidas en el espectro UV-Visible del compuesto 02 de la ascidia *Rhopalaea* sp.

Longitud de onda (λ)	Absorbancia
250 nm	0.100
295 nm	0.075

3.3.2.2 Infrarrojo con Transformada de Fourier

El espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) del compuesto 02 (Figura 3.10), presenta una banda en 3080 cm^{-1} característica al estiramiento C-H de los carbonos con hibridación sp^2 pertenecientes a anillos aromáticos. El alargamiento de los dobles enlaces del anillo aromático está representado por las señales en la región de 1580 cm^{-1} y 1470 cm^{-1} . La banda cerca a 1615 cm^{-1} representa una banda característica de carbonilos conjugados debido al estiramiento C=O. La banda media alrededor de $3370\text{-}3345\text{ cm}^{-1}$ es típica del O-H de los compuestos fenólicos, que es confirmada con la banda de 1245 cm^{-1} (Pavia et al., 2001).

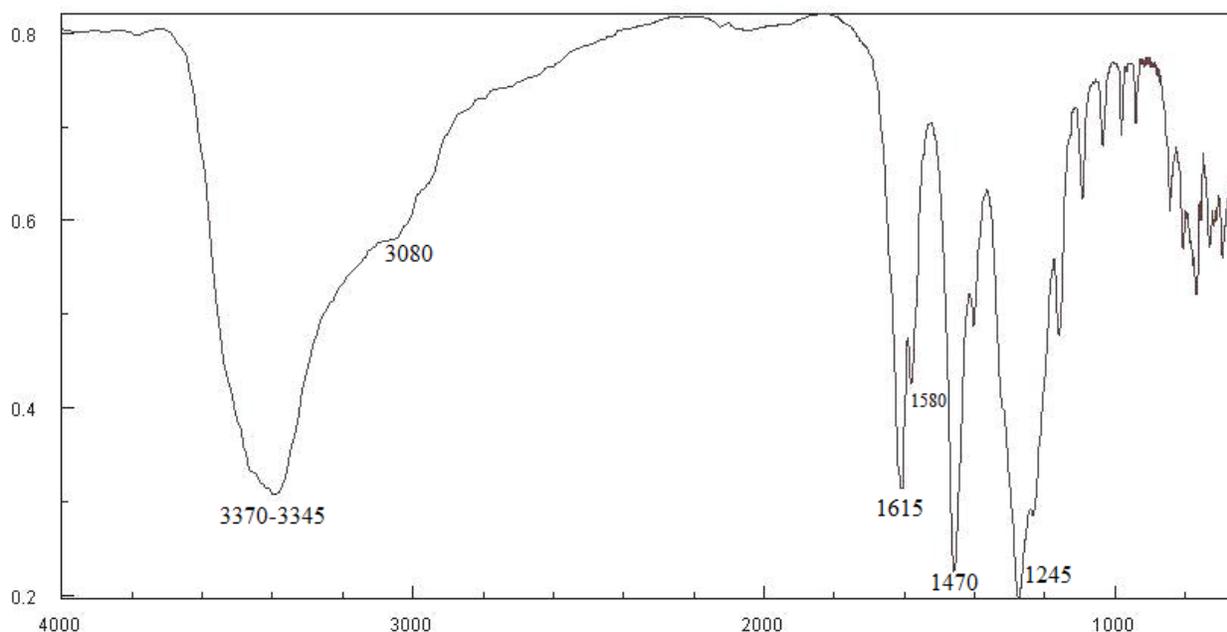


Figura 3.10. Espectro infrarrojo del compuesto 02 de la ascidia *Rhopalaea* sp. analizado en el equipo Bruker Modelo IFS 66 v/S en una pastilla de KBr

3.3.2.3 Espectrometría de masas

Como se observa en la Figura 3.11 el espectro de masas presenta un pico base en 257 m/z y las razones isotópicas de su x+1 y x+2 se muestran en el cuadro 3.7. Con la información de estas razones isotópicas se puede obtener una fórmula molecular de C₁₄H₈O₅, las aportaciones de sus átomos se resumen en el cuadro 3.7. Este compuesto presenta baja volatilidad ya que no presentó señal en el GC-MS para reproducir el valor obtenido en el LC/MS/MS.

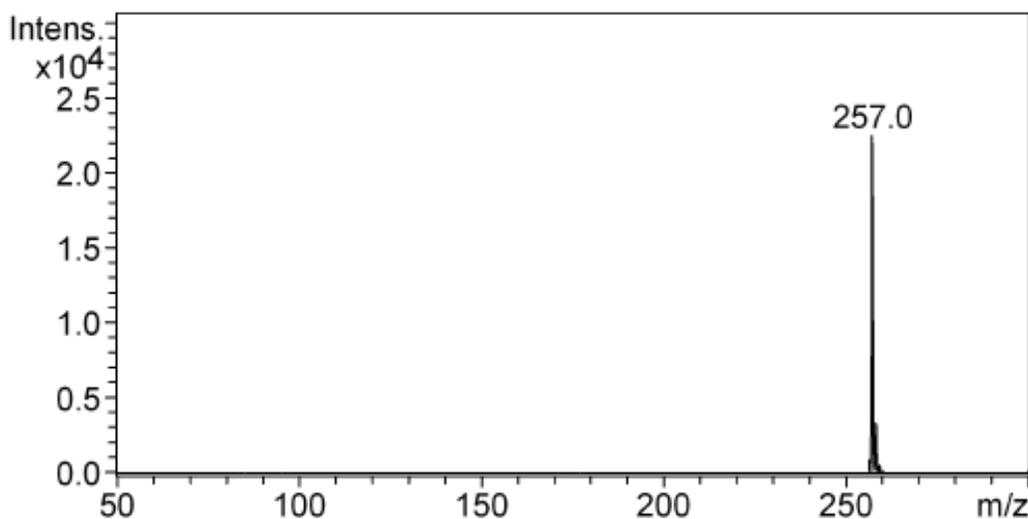


Figura 3.11. Espectro de masas del compuesto 02 de la ascidia *Rhopalaea* sp. realizado en un MS/MS Bruker Esquire 6000 con ionización de electrospray en modo positivo.

Cuadro 3.7. Señales del espectro de masas y relación isotópica de los picos correspondientes al ion molecular del compuesto 02 de la ascidia *Rhopalacea* sp.

Masa	Intensidad	14 C	5 O
257,0	100.0		
258,0	15.6	15.40	0.20
259,0	2.3	1.18	1.00

3.3.2.4. Resonancia Magnética Nuclear

3.3.2.4.1. ^{13}C RMN

El análisis de este espectro (500 MHz) (Figura 3.12) confirma la fórmula molecular sugerida por el análisis de espectrometría de masas al presentar 14 señales para carbono (Cuadro 3.8). Hay dos señales a campo bajo de 187.15 ppm y 183.83 ppm, que son valores característicos para los carbonos pertenecientes a un grupo carbonilo de cetonas o aldehídos y se encuentra cercano al valor de ácidos y ésteres (Pavia et al., 2001). Las señales comprendidas entre 160.88 y 105.60 ppm las cuales son características de carbonos de anillos aromáticos sugieren la presencia de dos anillos en la estructura, y debido a la presencia de las 12 señales indica que no hay plano de simetría para estos anillos. El valor base para estos carbonos es de 128.5 ppm (Pavia et al., 2001), sin embargo, el desplazamiento hacia campo bajo de los carbonos a 160.88, 157.60 y 149.79 ppm del anillo sugiere la posible presencia del grupo hidroxilo unido a estos carbonos, cuyo desplazamiento es comparable a los reportados en modelos fenólicos análogos. Las posiciones de los sustituyentes en el anillo aromático son atribuidas a los desplazamientos químicos de carbono ^{13}C (*ipso*, *orto*, *meta* y *para*) que dichos sustituyentes provocan a los carbonos del anillo aromático (Pavia et al., 2001).

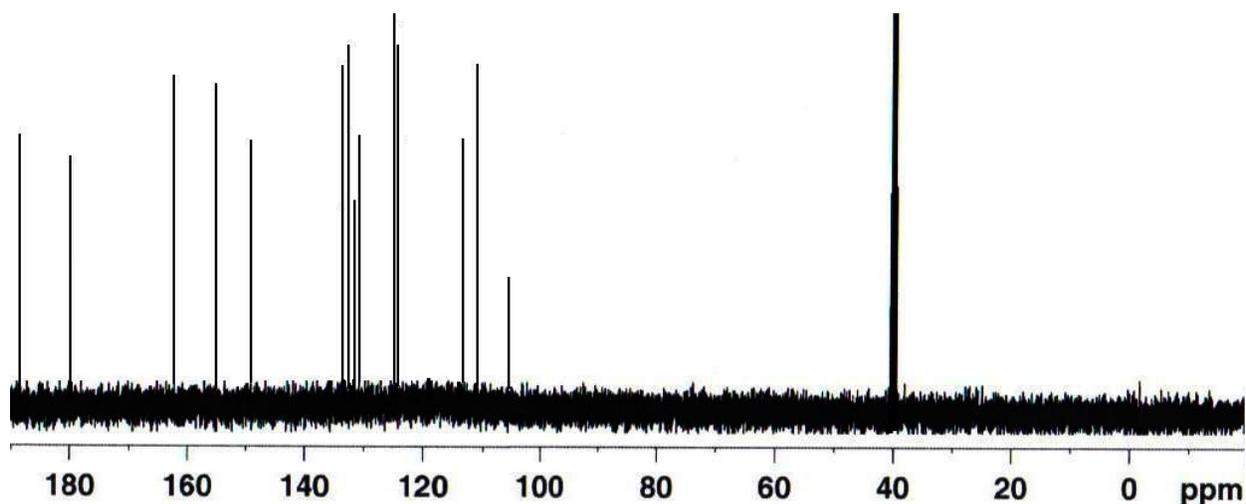


Figura 3.12. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 02 de la ascidia *Rhopalaea* sp. disuelto en DMSO-d_6 , realizado en un NMR Bruker Avance de 500 MHz

Cuadro 3.8. Desplazamientos de cada uno de los carbonos en el espectro de ^{13}C RMN para el compuesto 02 de la ascidia *Rhopalacea* sp.

# de ^{13}C	ppm	# de ^{13}C	ppm
1	187.15	8	133.88
2	183.83	9	132.99
3	160.88	10	126.97
4	157.60	11	126.74
5	149.79	12	112.89
6	135.44	13	110.16
7	134.60	14	105.60

3.3.2.4.2. ^1H RMN

Las señales mostradas por el espectro de ^{13}C -RMN son consistentes con el espectro de ^1H -RMN. El análisis del espectro de ^1H -RMN (500 MHz) (Figura 3.13), muestra una señal a campo bajo: δ 13.35 (s), que se le atribuye a un hidrógeno unido al oxígeno perteneciente al carbono del fenol que se encuentra en posición β con respecto al grupo carbonílico de la molécula. Dicho protón interacciona por un puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonílico, como se muestra en la Figura 3.14. Este fenómeno desplaza el protón del fenol a campo muy bajo (Pavia et al., 2001).

Otras señales a campo bajo en δ 8.15-8.19 (t, 2H) y δ 7.87-7.94 (m, 3H) son características de los hidrógenos unidos a un anillo aromático, los cuales son desapantallados por el campo anisotrópico generado por los electrones en el sistema π del anillo (Pavia et al., 2001). Los desdoblamientos principales muestran un triplete y un multiplete para cada uno de los grupos de señales, indicando una sustitución compleja de segundo orden en los anillos. La constante de acoplamiento ($^3J=7.65$ Hz) confirma posiciones orto entre hidrógenos. El agrandamiento de las señales muestra el desdoblamiento complejo de segundo orden, común para este tipo de sistemas de anillos sustituidos (Pavia et al., 2001).

Una señal en δ 7.37 (s, 1H) y otra a 6.63 (s, 1H) pueden ser atribuidas al protón de un grupo hidroxilo unido al anillo aromático de la molécula, el cual no interactúa con ningún otro grupo funcional del compuesto. El desplazamiento a campo bajo del hidrógeno es debido al desapantallamiento por el campo anisotrópico del anillo y la resonancia que deslocaliza la densidad de electrones del oxígeno y cambia su hibridación (Pavia et al. 2001).

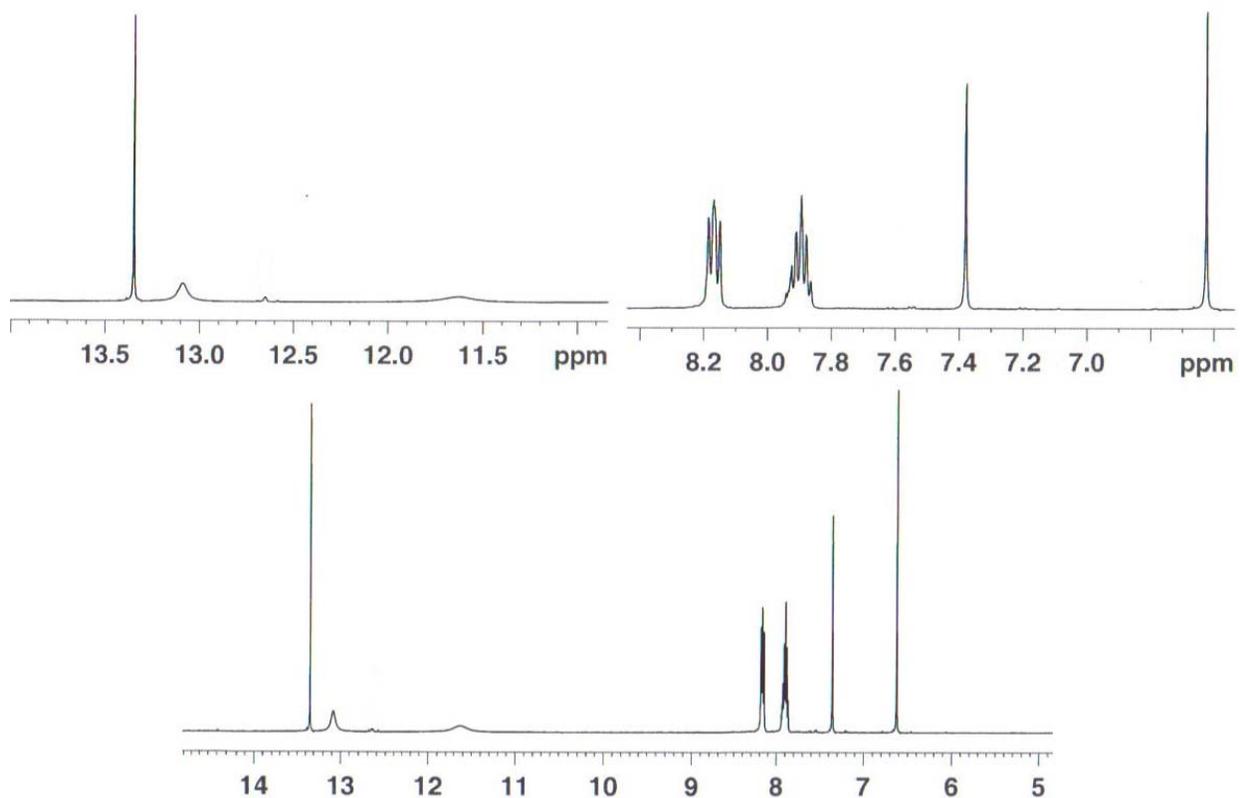


Figura 3.13. Espectro de ^1H RMN del compuesto 02 de la ascidia *Rhopalaea* sp. disuelto en DMSO-d_6 , realizado en un NMR Bruker Avance de 500 MHz

Cuadro 3.9. Información espectroscópica de cada una de las señales del espectro de ^1H RMN para el compuesto 02 de la ascidia *Rhopalacea* sp.

# H	ppm	^3J (Hz)	Splitting	Integración
1	13.35	-	s	1 H
2	8.15-8.19	7.71	t	2 H
3	7.94-7.87	7.58	m	3 H
4	7.37	-	s	1 H
5	6.63	-	s	1 H

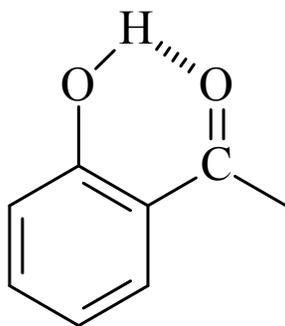


Figura 3.14. Puente de hidrógeno responsable de desplazar dicho hidrógeno del fenol a campo bajo en el espectro ^1H -RMN

La evidencia sugiere para el compuesto 01 aislado de la ascidia *Rhopalaea* sp. una base química de una cumarina o derivado de la misma, las cuales han sido reportadas en la literatura como compuestos base de estructuras con actividad citotóxica (Joullie et al., 2003; Rami et al., 1999). Joullie et al (2003) reportaron análogos fluorescentes de los metabolitos didemnin B y tamandarin por su potencial químico en mecanismos de defensa de tunicados en la familia Didemnidae. Estos compuestos se les encontraron una alta relación antidepredadora, inhibiendo la síntesis de proteína, iniciando apoptosis y reduciendo la proliferación celular. Rami et al (1999) encontraron un nuevo inhibidor de la integrasa del HIV-1, llamado lamellarin α 20 sulfato. En su estructura se aloja una base de cumarina, la cual se ha encontrado en estudios previos que es un activo inhibidor de integrasa. Las cumarinas (Figura 3.15) se les ha otorgado dentro de sus propiedades la de poseer un rol en organismos que parece ser de defensa, dándole propiedades de rechazo a la alimentación (en inglés *antifeedant*), antimicrobiana, captadora de radiación UV e inhibidora de la germinación (Merck et al., 2001), sugiriendo un posible rol del compuesto encontrado con la actividad citotóxica reportada contra *Staphylococcus aureus* y *Geotrichum candidum*.

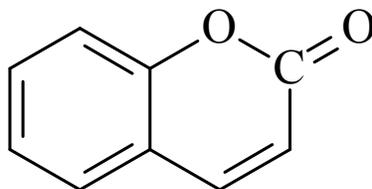


Figura 3.15. Estructura base de una cumarina

Para el compuesto 02 aislado de la ascidia *Rhopalaea* sp. en su extracto acetónico, la evidencia espectroscópica sugiere una base química de una hidroxiantraquinona (Figura 3.16), las cuales han sido reportadas en la literatura como compuestos presentes en algunas ascidias (McClintock and Baker, 2001). Poumale et al (2006) descubrieron dos nuevas antraquinonas aisladas del organismo *Streptomyces* sp de la ascidia *Ecteinascidia* sp. siendo identificadas como 8-hidroxio-3-metoxi-1-propil-antraquinona y 3,8-dihidroxio-1-propil-antraquinona, luego de un intenso análisis espectroscópico. Algunos de sus derivados fueron ensayados para actividad biológica dando resultados positivos.

Otro estudio químico de un Streptomycete aislado de una bacteria asociada con el tunicado tropical *Ecteinascidia turbinata* mostró la purificación de dos metabolitos antibacteriales con una base de bisantraquinona (Socha et al., 2006). Sus potentes propiedades antibacteriales contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* y actividad contra células HCT-116 fueron demostrados. Issa et al (2003) encontraron tres Floresólidos; A 627, B 628 y C 629 los cuales tienen una base química de hidroquinonas las cuales mostraron propiedades citotóxicas. Estas fueron aisladas de la ascidia *Aplidium* sp. en la isla Flores, Portugal. Estos resultados pueden sugerir también un posible rol del compuesto encontrado con la actividad citotóxica reportada contra *Staphylococcus aureus* y *Geotrichum candidum*.

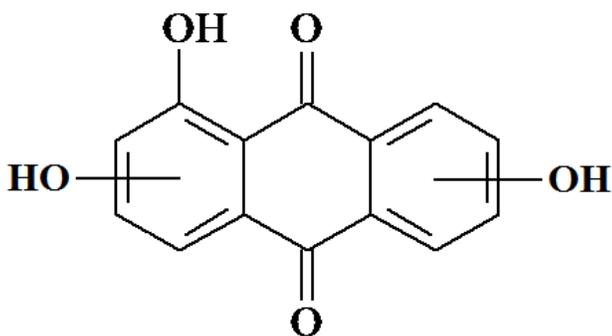


Figura 3.16. Estructura base de una hidroxiantraquinona

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

4.1.1. Se comprobó la actividad antibacterial de la ascidia *Rhopalaea* sp. contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, y la actividad antifúngica contra el hongo *Geotrichum candidum* tanto en su extracto crudo de acetona como en la fracción 4.

4.1.2 Se comprobó una mayor eficiencia en la extracción del compuesto en acetona que en etanol, debido a la mayor actividad y mayor espectro de inhibición presentado en los organismos ensayados.

4.1.3. La actividad inhibitoria encontrada en los extractos crudos es significativa si se compara con la de los antibióticos comerciales, siendo el mayor valor reportado, similar al observado en los discos evaluados con cloranfenicol y el miconazol, sin embargo, las comparaciones no son cuantitativas debido a que no se ensayaron concentraciones analíticas ni se aplicaron pruebas estadísticas. Los ensayos al ser cualitativos solo reflejan la existencia de metabolitos activos para un microorganismo específico.

4.1.4. Se caracterizó como una cumarina y una hidroxiantraquinona a la naturaleza química de los compuestos aislados del extracto activo de la ascidia *Rhopalaea* sp. contra los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Geotrichum candidum*.

4.1.5. Se logró establecer un protocolo de separación que permite la recuperación de los compuestos a través de cromatografía y extracción en fase sólida.

4.2 Recomendaciones

4.2.1 Evaluar cuantitativamente la actividad inhibitoria de la ascidia *Rhopalaea* sp. contra *Staphylococcus aureus*, para elaborar curvas que relacionen la concentración de los extractos con el nivel de inhibición de los microorganismos, con el objetivo de obtener su LD₅₀. No se recomienda industrializar un extracto natural de ascidia sin un estudio exhaustivo que implique ensayos a una mayor escala.

4.2.2. Realizar la determinación de la actividad antifúngica de la ascidia *Rhopalaea* sp. de forma cuantitativa contra *Geotrichum candidum*, para evaluar su potencial como recurso de metabolitos en la búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos.

4.2.3 Ensayar diferentes pruebas farmacológicas para examinar otras propiedades que pueda tener la ascidia *Rhopalaea* sp. además de hallar nuevos metabolitos presentes en la ascidia que puedan tener propiedades benignas contra otros patógenos.

4.2.4. Enfocarse en la elucidación estructural de los metabolitos responsables de la actividad presentada como un inicio en la búsqueda de posibles mecanismos de acción y para la síntesis de fármacos potencialmente utilizables como alternativa de antibióticos comerciales.

4.2.5. Formular un fungicida o antibiótico a partir de extractos de *Rhopalaea* sp. reportada en este estudio y ensayarlo en el campo, realizando comparaciones con productos químicos de uso común utilizados con el mismo fin.

4.2.6. Desarrollar investigaciones sobre la evaluación de urocordados del Caribe y del Pacífico que puedan presentar diferentes aplicaciones en la industria, la medicina, cosmetología, microbiología y otros campos.

LITERATURA CITADA

AL-Zereini, W. 2006. "Natural products from marine bacteria". Tesis PhD. University of Kaiserslautern, Alemania.

Bakus, G. J., N. M. Targett & B. Schulte. 1986. "Chemical ecology of marine organism: An overview". *J. Chem. Ecol.* 12(5): 951-987.

Berkow, R. & A. Fletcher. 1990. "El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica". 8^{va} Ed. Merck & Co., Inc. 25-80.

Blunt, J. W., B. Copp, M. Munro, P. Nortcote & M. Prinsep. 2006. "Marine natural products". *J. Nat. Prod.* 22: 15-68.

Caccamese, S. R., G. Azolina, M. Furnari, M. Cormaci & S. Grasso. 1980. "Antimicrobial and antiviral activities of extracts from Mediterranean algae". *Bot. Mar.* 23: 285-288.

Carballo, J. L. "Aportación al conocimiento de la fauna de Ascidiás del litoral Pacífico de México". 2006. Universidad Nacional Autónoma de México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. BC005 México D.F.

Caridad, A. 2005. "Taxonomía, sistemática y ecología de las ascidias". Informe del Instituto de Oceanología de Cuba, Departamento de Biología Marina.

Davidson, B. S. 1993. "Ascidians: producers of amino acid-derived metabolites" *Chem. Rev.* 93 (5): 1771-1791.

Davies-Coleman, M. & D. Beukes. 2004. "Ten years of marine natural products research at Rhodes University". *South African Journal of Sciences.* 100:539-544.

Díaz-Piferrer, M. 1979. "Contributions and Potentialities of Caribbean Marine Organisms in Pharmacology". Departamento de Ciencias Marinas. Universidad de Puerto Rico.

De Lara-Isassi, G. & M. E. Ponce-Márquez. 1991. "Detección de la actividad antibacteriana de algunas algas de Playa Paraíso, Veracruz, México". *Biotam* 3: 20-26.

De Lara-Isassi, G., S. Alvarez-Hernández & C. Lozano-Ramírez. 1996. "Actividad antibacteriana de algas marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano". *Rev. Biol. Trop.* 44(2): 895-898.

Doisy, X., D. Ifrah & P. Hansen. 2004. "Monomeric analogues of halocidin". *Organic & biomolecular chemistry*. 2 (19): 2757-2762.

Faulkner, J. 2002. "Marine Natural Products". *J. Nat. Prod. Rep.* 19:1-48.

Fenical, W., V. J. Paul & N. Lindquist. 1990. "Chemical defenses of the tropical ascidian *Atapozoa* sp. and its nudibranch predators *Nembrotha* spp". *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 59: 109- 118.

Franco, L. H., E. Bal de Kier Joffe, L. Puricelli, M. Tatian, A. M. Seldes & J. A. Palermo. 1998. "Indole alkaloids from the tunicate *Aplidium meridianum*" *J. Nat. Prod.* 61 (9): 1130-1132.

Fuller, R. W., J. H. Cardellina, Y. Kato, L. S. Brinen, J. Clardy, K. M. Snader & M. R. Boyd. 1992. "A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines". *J. Med. Chem.* 35: 3007-3011.

García, A., M. J. Vázquez, E. Quínoa, R. Riguera & C. Debitus. 1996. "New Amino Acid Derivates from the Marine Ascidian *Leptoclinides dubius*". *J. Nat. Prod.* 59:782-785.

García, F. 2007. “Diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos entre bacterias de origen humano, animal y agrícola: impacto en la Salud Pública y en el medio ambiente”. *Boletín Ciencia y Tecnología* 56.

García, F. 2001. “Manual de laboratorio para pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos”. Facultad de Investigación en Enfermedades Tropicales. Facultad de Microbiología. UCR. 198 pp.

González, F. & M. Silva. 2001. “Biodiversidad química de macroalgas marinas. En: Sustentabilidad de la biodiversidad un problema actual”. Alveal K. & T. Antezana (Eds) 1^{era} Ed. Universidad de Concepción de Chile. 496 pp.

Green, G. 1977. “Ecology of toxicity in marine sponges”. *Mar. Biol.* 40: 207-215.

Hooper, G. J. 1995. “New antimicrobial C₁₄ y C₁₃ amines from a South African marine ascidian”. *Nat. Prod. Lett.* 6:31-35.

Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica. 2007. <http://www.inbio.ac.cr>

Issa, H. H., J. Tanaka, R. Rachmat & T. Higa. 2003. “Floresolidos, new metacyclophane hidroquinone lactones from ascidian, *Aplidium* sp”. *Tetrahedron* 44 (6): 1243-1245.

Jawetz, R. 1999. “Microbiología Médica”. 16^a ed, Manual Moderno, México. 450 pp.

Jorgensen, J. H. & J. D. Turnidge. 1999. “Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disc diffusion methods. *Manual of Clinical Microbiology*”. Washington J.A. 7th ed. 1526-1543.

Joullie, M. M., M. S. Leonard, P. Portonovo, B. Liang, X. Ding & J. J. La Clair. 2003. “Chemical Defense in Ascidians of the Didemnidae Family”. *Bioconjugate Chem.* 14: 30-37.

- Kiraz, N., O. Ang, Y. Akgun & Z. Erturan. 2000. "Phenotypic variation and antifungal susceptibility patterns of *Candida albicans* strains isolated from neutropenic patients". *Mycoses*. 43:119-123.
- Lehrer, R. J., A. Tincu, S. Taylor, L. Menzel & A. Waring. 2003. "Natural Peptide Antibiotics from Tunicates: Structures, Functions and Potential Uses". *Integr. Comp. Biol.*43:313-322.
- Liu, H., T. Fujiwara, T. Nishikawa, Y. Mishima, H. Nagai, T. Shida, K. Tachibana, H. Kobayashi, R. Mangindaan & M. Namikoshi. 2005. "Lissoclibadins 1–3, three new polysulfur alkaloids, from the ascidian *Lissoclinum cf. badium*" *Tetrahedron* Vol 61, No 36: 8611-8615.
- Makawva, T., V. Stonik, A. Dmitrenok, B. Grebnev, V. Isakov & N. Reeiachyk. 1995. "Varacin and three new marine antimicrobial polysulfides from the far-eastern ascidian *Polycztor* sp". *J. Nat. Prod.* 58:2.254-258.
- Mann, J. 1996. "Secondary Metabolism". 2nd Ed. Oxford Chemistry Series, United State of America, New York. 1-7.
- Merck, M., J. O'neil, A. Smith, P. E. Heckelman & S. Budavari. 2001. "Merck Index" John Wiley & Sons; 13th ed, 2564 pp.
- McClintock, J. B. & B. J. Baker. 2001. "Marine Chemical Ecology". *Marine Science Series*. Washington, D.C. 23-25.
- Mohn, Z., I. Jantan, A. Awaludin & N. Wasi. 2002. "Mosquito Repellent Activity of the Methanol Extracts of Some Ascidian Species". *Pharmaceutical Biology*, 40 (5): 358-361.
- Pavia, D., G. Lampman & G. Kriz. 2001. "Introduction to Spectroscopy". 3rd Ed. Harcourt College Publishers. USA, 579 pp.

Pesando, D. 1990. "Antibacterial and antifungal activities of marine algae". Akatsuka (Ed). *Introd. Applied Phycology*. SPS Acad. Pub. Netherlands pp. 3-26.

Pesando, D. & B. Caram. 1984. "Screening of marine algae from the French Mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity". *J. Bot. Mar.* 27: 381-386.

Proksch, P., R. Ebel, R. Edrada, R. Schupp, P. Lin, W. Sudarsono., V. Wray & K. Steube. 2003. "Detection of pharmacologically active natural products using ecology". *Pure. Appl. Chem.* 75(2): 343 –352.

Pough, F. H. 1999. "Vertebrate life". 5th Ed. Prentice Hall, N.J., USA, 584 pp.

Poumale, H. M., B. T. Ngadjui, E. Helmke & H. Laatsch. 2006. "New anthraquinones from a marine *Streptomyces* sp. – isolation, structure determination and biological activities". *J. Chem. Scien.* 61(11): 1450-1454.

Rajeev, K. J. & X. Zi-rong. 2004. "Biomedical Compounds from Marine Organisms". *Mar. Drugs.* 2: 123-146.

Rami, M. V., M. R. Rao, D. Rhodes, M. S. Hansen, K. Rubins, F. D. Bushman, Y. Venkateswarlu & D. J. Faulkner. 1999. "Lamellarin α 20-Sulfate, an Inhibitor of HIV-1 Integrase Active against HIV-1 Virus in Cell Culture". *J. Med. Chem.* 42, 1901-1907.

Rao, P. & K. S. Parekh. 1981. "Antibacterial activity of Indian seaweeds extracts". *Bot. Mar.* 24: 577-582.

Riguera, R. 1997. "Isolating bioactive compounds from marine organism". *J. Mar Biotechnol* 5:187–19.

Rinehart, K. L. 2000. "Antitumor compounds from tunicates". Department of Chemistry, University of Illinois, 454 Roger Adams Laboratory, 600 So. Mathews Avenue, Urbana, Illinois 61801.

Ruppert, E. & R. D. Barnes. 1996. "Zoología de los invertebrados". 6^{ta} Ed. Mc-Graw Hill Interamericana 1108 pp.

Salhi, M. 2005. "Urochordata". Zoological Science. 18: 447-464.

Sato, H., M. Tsuda, K. Watanabe and J. Kobayashi, 1998. "Rhopaladins A-D, new indole alkaloids from marine tunicate *Rhopalaea* sp." *Tetrahedron*, Vol 54, no 30, pp. 8687-8690.

Schwimmer, M. & D. Schwimmer. 1955. "The role of algae and plankton in medicine". Grune and Stratton. New York. 185p.

Silverstein R. 1991. "Spectrometric Identification of Organic Compounds". 5th ed, John Wiley and Sons, INC, USA. 800p.

Socha, A. M., D. García, R. Scheffer & D. C. Rowley. 2006. "Antibiotic bisanthraquinone produced by a *Streptomyces* isolated from a cyanobacterium associated with *Ecteinascidia turbinata*". *J. Nat. Prod.* 69: 1070-1073.

Sreenivasa-Rao, P. & K. S. Parekh. 1981. "Antibacterial activity of Indian seaweed extracts". *Mar. Bot.* 24: 577-582.

Van Name, W. G. 1945. "The North and South American ascidians". Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 476 pp.

Vidyavathi, N. & K. R. Sridhar. 1991. "Seasonal and geographical variation in the antimicrobial activity of seaweeds from the Mangalore coast of India". *Bot. Mar.* 34: 279-284.

Wahl, M., W. Fenical & P. R. Jensen. 1994. "Chemical control of bacterial epibiosis on ascidians". *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 110: 45- 57.

ANEXOS



Foto 1. Secado de la ascidia *Rhopalaea* sp.

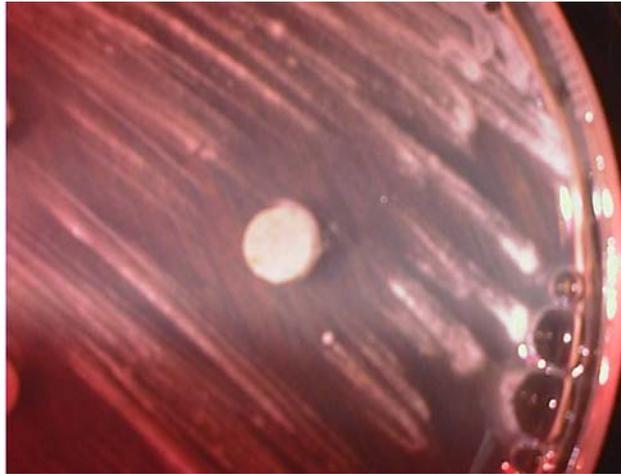


Foto 2. Halo de inhibición producido por el extracto crudo de acetona de *Rhopalaea* sp. contra *Staphylococcus aureus*



Foto 3. Halos de inhibición producidos por la fracción 4 de la ascidia *Rhopalaea* sp. contra *Staphylococcus aureus*



Foto 4. Blanco del bioensayo